



# Rôle des cellules de Kupffer et du microbiote intestinal dans les hépatopathies métaboliques

Gladys Ferrere

## ► To cite this version:

Gladys Ferrere. Rôle des cellules de Kupffer et du microbiote intestinal dans les hépatopathies métaboliques. Hépatologie et Gastroentérologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS275 . tel-01374862

**HAL Id: tel-01374862**

**<https://theses.hal.science/tel-01374862>**

Submitted on 2 Oct 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

2015SACLS275

**THESE DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,  
préparée à l'Université Paris Sud 11**

ÉCOLE DOCTORALE N°425  
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué  
Spécialité de doctorat : Immunologie

Par

**Mme FERRERE Gladys**

**Rôle des cellules de Kupffer et du microbiote  
intestinal dans les hépatopathies métaboliques**

**Thèse présentée et soutenue à Clamart, le 15 décembre 2015 :**

**Composition du Jury :**

M. Louvet Alexandre, PU-PH, Université de Lille, Président  
Mme Teixeira-Clerc Fatima, CR, Université Paris Est, Rapporteur  
Mme Prip-Buus Carina, DR, Université Paris Descartes, Rapporteur  
M. Tordjmann Thierry, DR, Université Paris-Sud 11, Examineur  
Mme Thomas Muriel, DR, Institut Agro Paris Tech, Examinatrice  
Mme Cassard Anne-Marie, CR, Université Paris-Sud 11, Directrice de thèse

Thèse effectuée dans l'équipe III dirigée par le Pr Perlemuter Gabriel de  
l'UMR\_S 996 (32, rue des Carnets 92 140 Clamart France)







**THESE DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,  
préparée à l'Université Paris Sud 11**

ÉCOLE DOCTORALE N°425  
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué  
Spécialité de doctorat : Immunologie

Par

**Mme FERRERE Gladys**

**Rôle des cellules de Kupffer et du microbiote  
intestinal dans les hépatopathies métaboliques**

**Thèse présentée et soutenue à Clamart, le 15 décembre 2015 :**

**Composition du Jury :**

M. Louvet Alexandre, PU-PH, Université de Lille, Président  
Mme Teixeira-Clerc Fatima, CR, Université Paris Est, Rapporteur  
Mme Prip-Buus Carina, DR, Université Paris Descartes, Rapporteur  
M. Tordjmann Thierry, DR, Université Paris-Sud 11, Examineur  
Mme Thomas Muriel, DR, Institut Agro Paris Tech, Examinatrice  
Mme Cassard Anne-Marie, CR, Université Paris-Sud 11, Directrice de thèse

Thèse effectuée dans l'équipe III dirigée par le Pr Perlemuter Gabriel de  
l'UMR\_S 996 (32, rue des Carnets 92 140 Clamart France)





# REMERCIEMENTS

Voilà une grande page de ma vie qui se tourne : la thèse se termine. Elle a été pour moi une grande expérience professionnelle, mais aussi de grandes rencontres humaines.

En effet, si la thèse a été une période agréable et surtout supportable, c'est parce que de nombreuses personnes ont contribué à me maintenir et me soutenir dans les différents passages (aussi bien les articles acceptés que les manip ratées).

C'est pourquoi à travers ces quelques mots, je voudrais leur montrer ma gratitude.

Merci **aux membres de ce jury** pour l'intérêt porté à mon travail de thèse, notamment aux rapporteurs qui m'ont permis d'améliorer ce manuscrit.

**Anne-Marie**, ces quelques mots ne seront pas suffisants pour les remerciements que je te dois et que tu mérites. En effet, si cette thèse a pu commencée c'est surtout grâce à la confiance que tu as eu en moi. Je suis arrivée il y a cela 4 ans. Malgré un CV plus ciblé chimie que biologie, tu as bien voulu commencer cette aventure avec moi.

Au début, mes habitudes étaient loin d'être celles d'un biologiste avéré. Mais tes conseils et ton soutien m'ont permis de m'améliorer de jour en jour. Nos longues discussions sur les résultats d'expériences et l'accompagnement que tu m'as donné m'ont soutenu dans ce long chemin vers la connaissance. Tu as toujours été très conciliante avec moi et tu m'as laissé la liberté suffisante pour que je puisse tester ma curiosité scientifique. Tu as rapidement su comment mon esprit fonctionnait, à tel point que maintenant je vois que tu peux comprendre exactement mes difficultés. Merci pour ces projets qui m'ont toujours passionné et m'ont permis de rester tout le temps la première optimiste face aux résultats. Et même si on peut penser que les protocoles étaient longs et bien malgré tout... tu m'as donné le goût à la recherche. Et malgré mes incertitudes et mon mauvais caractère qui étaient parfois présent, tu as toujours gardé ta patience. Merci aussi d'avoir lu, relu et encore relu mon manuscrit : sans tes conseils, je ne sais pas trop vers où je serais allée mais probablement vers l'écriture d'une encyclopédie.

Et puis, je n'oublie pas que je te dois aussi la découverte de la course à pied, car tu as été la première à m'initier. Ton esprit sportif détient sur moi, qui sait peut-être que je me mettrai au badminton ? En bref, merci d'avoir toujours été aussi naturelle et direct avec moi, ça a été un réel plaisir d'avancer dans cette équipe sous ta direction. Que ce soit au niveau professionnel ou privé, tu es vraiment remarquable et je t'en remercie du fond du cœur.

Je tiens aussi à remercier **Gabriel**, qui a été très impliqué dans mes différents projets et qui a toujours été d'une aide scientifique précieuse. Tu as été la personne que je craignais le plus en répétitions d'oraux car tu me déstabilisais, mais du coup, cela a été d'une grande aide.

Je remercie aussi les **GP Girls** : Merci de m'avoir supporter quand j'ai fait tous mes caprices, mes boudages, de m'avoir aidé dans mes différentes collections Lidl et d'avoir écouté mes chants, mes expressions inconnues. Quoi qu'il en soit GP Girls un jour GP Girls toujours.

**Vivi**, tu sais que tu es le rayon de soleil de notre équipe, toujours le sourire et toujours prête à aider. Dès ton entretien, j'ai tout de suite su que l'on s'entendrait à merveille toutes les

deux. Ton efficacité et ton entrain m'ont permis d'avancer et de dépasser mes limites professionnelles. Il ne m'a fallu seulement 2h pour te faire une confiance aveugle pour les expériences, faisant de toi mon âme-sœur du labo ! Tu as été aussi une binôme dans le sport (piscine, course à pied, rien ne nous arrête), où tu as été un exemple à suivre (bon pas encore atteint mais en cours d'obtention). Merci pour tout.... Je te souhaite que du bonheur autant professionnel que personnel (un bébé ?), et ne t'inquiète pas je t'embêterai encore.

Ma très chère **Laura**, je te remercie aussi pour tout. Ta nature calme et douce a toujours été un précieux cadeau pour moi. Je sais que notre entente n'a pas été parfaite tout le temps mais comme tu me l'as fait remarqué je pense que nous avons le même caractère et que du coup.... Ça peut faire des étincelles. Mais même si je n'ai pas toujours été facile (surtout avec une femme enceinte), j'aime ta personnalité, ton humour, ta générosité, ton tempérament, (et tes hommes sont des amours ☺) donc je sais (enfin j'espère) que l'on se reverra ... et oui quand je serai moi aussi enceinte, je viendrai t'embêter pour faire du scrapbooking!

**Madeleine**, je te remercie déjà de continuer mes projets et j'espère que tu tiendras le choc et garde un optimiste d'enfer, la chance te suivra (en tout cas je n'en doute pas), toutes les cartes sont en ta possession et je pense que tu as un caractère agréable qui te mènera loin. Je te souhaite plein de bonnes choses autant professionnellement que personnellement. Et saches que si tu veux parler thèse ou autre, je ne suis pas loin donc....tu peux ;).

Merci aussi à **Françoise B.** pour tes conseils, tes passages le soir pour me souhaiter une bonne soirée, ton sourire, et ton soutien qui ont contribué à mon épanouissement ici.

Je veux aussi remercier ma chère **Mylène** qui a été une grande aide pour mes manip (merci d'avoir gardé en vie mes souris avant leur grand moment d'importance pour la recherche). Mais surtout merci d'avoir été ma première « copine » du labo, ce soutien que tu m'as donné pendant ces 3 ans de thèse a été vraiment précieux, merci de m'avoir écoutée et aussi d'avoir été toujours là pour mes moments de « pause » pour aller à la piscine ou autre. Tu es devenu une grande amie dans le privé et je sais que l'attachement que l'on a est très grand, je serai là pour la suite de ton parcours et je continuerai à te voir évoluer.

Merci aussi à **Baptiste** pour avoir été présent et m'avoir répété sans cesse que j'étais susceptible et que je prenais tout mal... et je te manquera sûrement (qui sait ?) ! Trèves de plaisanterie, merci d'avoir été attentif, calme et surtout accueillant en toute occasion.

Un grand remerciement pour **Odile**, qui n'a pas été qu'une gestionnaire exemplaire, tu as aussi été une oreille attentive qui a su m'aider pour les petits problèmes de labo mais aussi de thésarde ! Saches que ton sourire est un allié important et ta patience (surtout au niveau des commandes tardives) a toujours été sans faille. Ne change pas on t'aime comme cela.

**Marie-Laure** je te remercie pour tes conseils, ta générosité, ta patience, d'être restée à mes côtés pour dompter le Fortessa. Je voudrais remercier aussi **Hélène** pour ses nombreuses discussions et sa confiance, **Françoise G.** pour ses nombreuses rigolades, **Dominique** pour sa compréhension, **Agnieska**, qui a su être franche, accessible et compatissante.

Merci à **Joseph** ton soutien quelque soit mes réflexions et mes appréhensions, tes conseils, ton calme, ta générosité et ton énergie ont vraiment été des alliés pour avancer. Merci d'avoir toujours été prêt à continuer de longues soirées manip ! Merci **Aude**, tu as été une compagne de bureau géniale et tu m'as motivée pour la rédaction.

Merci à **Laurélie** d'avoir été présente et d'avoir été aussi souriante et agréable quand tu travaillais avec nous mais aussi d'avoir été à mon écoute depuis ton départ.

Merci à **ma team running, Laurence**, notamment pour ton endurance mais aussi pour tes conseils et ton implication dans ma recherche d'emploi, **Géraldine**, pour m'avoir donné déjà la passion de l'immunologie en licence mais aussi pour ta présence pour aller courir et d'avoir toujours été attentive, **Karl**, de participer à nos courses pour... qu'on te court après, car tu cours plus vite (ça doit être parce que je suis petite). J'espère que vous continuerez à courir ensemble, et qu'on fera des courses ! Merci à **Marion**, pour sa gentillesse et son organisation des rencontres du jeudi, désolé encore de n'avoir pas pu plus m'impliquer mais je préfère donner l'idée et participer ! ☺

Merci aux bureaux KB pour leur présence et leur convivialité. En particulier **Christelle, Alexandre, Jess, Julie, Nagham** vous avez su égayer mes nombreuses soirées « travail ».

Je remercie aussi mes étudiants : **Albane, Camille, Romain, Adeline**, qui en plus d'avoir permis d'avancer mes travaux, ont été les initiateurs de mon intérêt pour l'enseignement. Sans oublier **les petits Débrouillard d'Ile de France**, qui m'ont permis d'encadrer des collégiens, et ont augmenté mon engouement pour l'encadrement des jeunes.

Un grand merci à l'ensemble de l'unité qui a contribué à cette expérience qui m'a énormément fait mûrir.

Mes amis aussi méritent de grands remerciements, notamment pour leur patience car j'ai du en annuler des soirées pour cette thèse. Tout d'abord, **Vanessa**, qui a su être là pour m'écouter et me dire de continuer quel qu'en soit les résultats, pour ses soirées où j'ai pu me couper un peu de tout pour mieux me refocaliser. **Sabrina** d'avoir su m'écouter et parler de mes doutes, de m'avoir donné des conseils et ceci à tout instant.

**Kagna** d'avoir été mon acolyte avec les petits Débrouillards, d'avoir eu la patience de relire ma thèse et d'avoir aussi été mon amie tout simplement.

**Jeanne-Marie, Hélène, Mylène, Hugo, Sermin, Julie, Aude** vous avez été présents à chaque instant et vous avez su me changer les idées, m'écouter. Merci **Mylène** tu m'a donné une semaine de vacances mémorables qui m'a permis de mieux entrevoir la rédaction de thèse.

Un très grand MERCI pour ma famille, notamment **mes parents**, qui m'ont élevés et permis d'être la personne que je suis aujourd'hui, votre soutien à toujours été ma plus grande force, l'amour que vous m'avez donné m'a permis d'avancer et les nombreux repas de famille ont toujours été un moment de partage qui me redonnait le sourire. Puis je remercie papa pour ces repas réunionnais qui ont réveillés et affolés mes papilles mais aussi celles de tout le labo ! Merci à mon frère **Jerem** et ma sœur **Meline**, mais aussi à ma belle famille, notamment ma **Floflo**, qui a été une oreille attentive même si on se voit peu.

Et pour finir je tiens à remercier **Cyril**, mon compagnon, qui a été le plus grand soutien au cours de cette thèse. Merci déjà de m'avoir supporté, d'avoir été patient, de m'avoir laissé tant de liberté pour pouvoir effectuer mes longues journées de travail. Merci de supporter mes petits caprices chaque jour et d'avoir été aussi présent et à l'écoute.

Et pour finir, merci à ces nombreuses **souris**, tout particulièrement **Bouboule, Vibrato et Tournicoti** qui ont données leur vie à la science. Cette thèse m'a bien appris qu'« en essayant continuellement on finit par réussir. Donc : plus ça rate, plus on a de chance que ça marche. »(*Shadocks*).



# SOMMAIRE

<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTE DES ABBREVIATIONS .....</b>	<b>11</b>
<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>15</b>
<b>CHAPITRE I. LE FOIE : ANATOMIE, FONCTION, CELLULES .....</b>	<b>17</b>
I.1. Anatomie du foie .....	17
I.2. Fonctions hépatiques .....	20
I.2.1. La synthèse et la redistribution des nutriments .....	21
I.2.2. Le stockage .....	25
I.2.3. Détoxification et protection immunitaire .....	26
I.3. Cellules du foie .....	27
I.3.1. Les hépatocytes .....	27
I.3.2. Les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques .....	28
I.3.3. Les cellules étoilées hépatiques .....	28
<b>CHAPITRE II. IMMUNITÉ DU FOIE .....</b>	<b>31</b>
II.1. Les lymphocytes intra-hépatiques .....	32
II.2. Les cellules présentatrices d'antigènes hépatiques .....	34
II.3. Les cellules de Kupffer .....	35
II.3.1. Caractérisation des monocytes/macrophages .....	36
II.3.2. Caractéristiques des cellules de Kupffer .....	39
<b>CHAPITRE III. LES MALADIES DU FOIE OU HEPATOPATHIES .....</b>	<b>43</b>
III.1. Les hépatopathies dues à une déficience génétique .....	44
III.2. Les hépatopathies dues à un virus .....	46
III.3. Les hépatopathies médicamenteuses .....	46
III.4. Les hépatopathies métaboliques .....	47
<b>CHAPITRE IV. LES HEPATOPATHIES METABOLIQUES LIEES A L'OBESITE OU NAFLD .....</b>	<b>49</b>
IV.1. L'obésité .....	49
IV.2. La NAFLD .....	54
IV.3. Les différents stades de la NAFLD .....	57
IV.3.1. La stéatose .....	57
IV.3.2. La stéatohépatite ou NASH .....	58
IV.3.3. La fibrose .....	58
IV.3.4. L'hépatocarcinome ou carcinome hépatocellulaire .....	59
IV.4. Les dérégulations métaboliques associées à la NAFLD .....	61
IV.4.1. Les acides gras acteurs de la stéatose .....	61
IV.4.2. Dérégulation de l'import-export des lipides .....	69
IV.5. De la stéatose à la NASH .....	70
IV.5.1. La théorie des deux hits .....	70
IV.5.2. Mécanismes participant à la NASH .....	71
IV.6. Perturbations immunitaires au cours de la NAFLD .....	77
IV.6.1. Les lymphocytes dans la NAFLD .....	77
IV.6.2. La cellule de Kupffer, un rôle clé dans la NASH .....	79
<b>CHAPITRE V. LES HEPATOPATHIES METABOLIQUES LIEES A L'ALCOOLISME OU MAF .....</b>	<b>83</b>
V.1. Définition .....	83
V.2. Développement de la MAF .....	85



V.3.	<i>Perturbations métaboliques dues à la MAF</i>	88
V.3.1.	Métabolisme hépatique de l'éthanol	89
V.3.2.	Impact de l'alcool sur les compositions membranaires	92
V.3.3.	Changement dans l'équilibre d'oxydo-réduction hépatique	93
V.4.	<i>Perturbations immunitaires dans la MAF</i>	94
V.4.1.	L'activation des cellules de Kupffer : actrice dans la progression de la MAF	94
V.4.2.	Altération des lymphocytes dans la MAF	97
<b>CHAPITRE VI.</b>	<b>LE MICROBIOTE INTESTINAL</b>	<b>101</b>
VI.1.	<i>Relation entre le foie et l'intestin</i>	101
VI.2.	<i>Le microbiote intestinal : un écosystème polyvalent</i>	102
VI.3.	<i>Fonction du MI</i>	105
VI.3.1.	Le MI et ses fonctions métaboliques	106
VI.3.2.	La synthèse de vitamines essentielles	108
VI.3.3.	Le MI et les défenses immunitaires	108
VI.4.	<i>Les espèces bactériennes du MI</i>	109
VI.5.	<i>Dysbiose du microbiote intestinal</i>	111
VI.5.1.	Dysbiose liée à la NAFLD	111
VI.5.2.	Dysbiose liée à la MAF	114
<b>PROJET DE THESE</b>		<b>117</b>
<b>RESULTATS</b>		<b>121</b>
<b>I. LA CELLULE DE KUPFFER, UNE ACTRICE DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA NAFLD</b>		<b>123</b>
I.1.	<i>Introduction</i>	125
I.2.	<i>Articles</i>	129
I.3.	<i>Résultats complémentaires et discussion</i>	133
<b>II. LE ROLE CAUSAL DU MICROBIOTE INTESTINAL DANS LA MALADIE ALCOOLIQUE DU FOIE</b>		<b>139</b>
II.1.	<i>Introduction</i>	141
II.2.	<i>Article</i>	145
II.3.	<i>Résultats complémentaires et discussion</i>	147
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>		<b>151</b>
<b>ANNEXES</b>		<b>159</b>
<b>I. ANNEXE 1</b>		<b>161</b>
<b>II. ANNEXE 2</b>		<b>165</b>
<b>III. ANNEXE 3</b>		<b>169</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>		<b>173</b>

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Anatomie du foie .....	17
Figure 2 : Organisation et vascularisation d'un lobule hépatique .....	19
Figure 3 : Schéma des différentes fonctions assurées par le foie .....	20
Figure 4 : Métabolisme et transport des lipides.....	22
Figure 5 : Cycle entéro-hépatique des acides biliaires .....	24
Figure 6 : Localisation des cellules au sein du parenchyme hépatique .....	27
Figure 7 : Répartition des populations cellulaires du foie .....	31
Figure 8 : Distributions des populations immunitaires dans le foie et le sang humain .....	32
Figure 9 : Vue d'une cellule de Kupffer entrant dans un sinusøide hépatique.....	35
Figure 10 : Les différentes voies de signalisation des TLR .....	36
Figure 11 : Polarisation M1/M2 des macrophages.....	38
Figure 12 : Schéma des différentes hépatopathies .....	43
Figure 13 : Maladies génétiques liées aux lipoprotéines.....	45
Figure 14 : Répartition mondiale de la prévalence de l'obésité en 2013 .....	50
Figure 15 : Evolution de l'obésité en 2030 dans différents pays .....	51
Figure 16 : Répartition de la population française selon les IMC .....	52
Figure 17 : Evolution de la prévalence de l'obésité en France depuis 1997.....	52
Figure 18 : Liste des critères d'évaluation du syndrome métabolique.....	53
Figure 19 : Les différents stades de la NAFLD.....	54
Figure 20 : Critères histologiques du score de NAS .....	55
Figure 21 : Score Metavir .....	56
Figure 22 : Score Child Pugh .....	56
Figure 23 : Homogénéité de la stéatose au sein du parenchyme hépatique .....	57
Figure 24 : Les différents stades de fibrose .....	59
Figure 25 : Corrélation entre le score MELD et la mortalité.....	60
Figure 26 : Provenance et utilisation des acides gras .....	62
Figure 27 : Lipogenèse <i>de novo</i> et formation des triglycérides .....	64
Figure 28 : Les principales voies de régulation de la lipogenèse hépatique.....	65
Figure 29 : Dégradation des acides gras par la $\beta$ -oxydation mitochondriale .....	68
Figure 30 : Altération de l'Apo-B 100 et de la MTTP au cours de la stéatose.....	70
Figure 31 : Théorie des deux hits.....	70
Figure 32 : Stress et peroxydation lipidique .....	72
Figure 33 : Importance de l'autophagie dans la stéatose.....	76
Figure 34 : Schéma de la signalisation de TLR 4 dans les cellules de Kupffer .....	81
Figure 35 : Equivalence de l'unité d'alcool en quantité de verre .....	84
Figure 36 : Homologies entre NAFLD et MAF .....	85
Figure 37 : Progression des stades au cours de la MAF.....	86
Figure 38 : Score de Maddrey.....	87
Figure 39 : Métabolisme de l'éthanol.....	89
Figure 40 : Les produits du métabolisme de l'alcool participent à la MAF.....	91
Figure 41 : Déséquilibre du rapport $NAD^+/NADH$ dans la MAF .....	92
Figure 42 : Le métabolisme de l'alcool participe à la stéatose .....	93
Figure 43 : Les différentes mutations des voies de la signalisation TLR 4 .....	96
Figure 44 : Modèle d'accélération de la fibrogenèse engendré par l'alcool .....	97

Figure 45 : Impact des lymphocytes NKT sur l'inflammation au cours de la MAF.....	99
Figure 46 : Classification du domaine des bactéries.....	103
Figure 47 : Schéma de la répartition du MI dans le TGI.....	104
Figure 48 : Photo d'un isolateur pour rongeur axénique .....	105
Figure 49 : Les différentes fonctions du microbiote intestinal.....	106
Figure 50 : Principaux phyla bactériens.....	109
Figure 51 : Code-barre bactérien spécifique de chaque individu .....	110
Figure 52 : Equivalence alcool/pectine de la souris à l'Homme .....	155

# LISTE DES ABBREVIATIONS

## A

ABCA : ATP-binding cassette 1  
ACC : acétyl-CoA carboxylase  
ADN : acide désoxyribonucléique  
AG : acide gras  
AGCC : acide gras à chaîne courte  
AGCM : acide gras à chaîne moyenne  
AGCL : acide gras à chaîne longue  
AGL : acide gras libre  
AKT : protéine kinase B  
AMP : adénosine monophosphate protein  
AMPK : AMP kinase  
AOX : fatty acyl-CoA oxidase  
Apo : apolipoprotéine  
ARN : acide ribonucléique  
ARNm : ARN messenger  
ATG : autophagy related genes  
ATP : adénosine-5'-triphosphate

## C

CCl<sub>4</sub> : tétrachlorure de carbone  
CD : cluster of differentiation  
CEH : cellule étoilée hépatique  
CHC : carcinome hépatocellulaire  
ChREBP : carbohydrate responsive element binding proteins  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
CPA : cellule présentatrice d'antigène  
CpG : cytosine phosphate guanine  
CPT : carnitine palmitoyl transférase  
CYP2E1 : cytochrome P450 2E1

## D-F

DC : dendritic cell  
DT2 : diabète de type 2  
FAD : flavine adénine dinucléotide  
FAS : fatty acid synthase  
FGF : fibroblast growth factor  
FISH : fluorescence in situ hybridization  
FITC : fluorescein isothiocyanate  
FXR : farnesoid X receptor

## G

G6P : Glucose-6-phosphatase  
GK : glucokinase  
GILZ : glucocorticoid-induced leucine zipper  
GLUT : glucose transporter  
GM-CSF : granulocytes macrophage colony-stimulating factor  
GR : glucocorticoid receptor

## H-I

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène  
HAA : hépatite alcoolique aiguë  
HDL : high density lipoprotein  
HFD : high fat diet  
HFE : High Fe  
HmG coA : hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA  
HNE : 4- hydroxynonenal  
IFN : interféron  
IDL : intermediary density lipoproteins  
IL : interleukine  
IMC : indice de masse corporelle  
IRF : interferon regulatory factor  
IRE : IFN-stimulated response element

## K-L

KC : kupffer cell  
LAL : lipase acide lysosomiale  
LBP : LPS-binding protein  
LDL : low density lipoprotein  
LDLR : LDL receptor  
LHS : Lipase hormono-sensible  
L-PK : L-pyruvate kinase  
LPL : lipoprotéine lipase  
LPS : lipopolysaccharide  
LSEC : liver sinusoidal endothelial cell

## M

MAF : maladie alcoolique du foie  
MD2 : myeloid differentiation protein 2  
MDA : malondialdéhyde  
mDC : DC myéloïdes

## M-N

MI : microbiote intestinal  
MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin  
MTA : macrophage du tissu adipeux  
MTTP : microsomal triglyceride transfer protein  
Myd88 : myeloid differentiation primary response gene 88  
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide  
NAFLD : non-alcoholic fatty liver disease  
NAS : NAFLD activity score  
NASH : non alcoholic steatohepatitis  
NKG2D : NK Group 2 member D  
NFκB : nuclear factor κ B  
NK : natural killer  
NKT : natural killer T  
noAH : sans hépatite alcoolique

## O-P-Q

OMS : organisation mondiale de la santé  
PAMP : pathogen-associated molecular pattern  
PCR : polymerase chain reaction  
pDC : DC plasmocytaire  
PDGF : platelet derived growth factor  
PERK : proline-rich extensin-like receptor kinase  
PI3K : phosphatidylinositol 3 kinase  
PKB : protéine kinase B  
PPAR : peroxisome proliferator-activated receptors  
PS : penicilline streptomycine  
qPCR : quantitative PCR

## R-S

RE : réticulum endoplasmique  
ROS : reactive oxygen species  
RNS : reactive nitrogen species  
RT qPCR : real-time quantitative polymerase chain reaction  
sAH : hépatite alcoolique sévère  
SCD : stéaroyl-CoA désaturase  
SCID : severe combined immunodeficiency  
siRNA : small interfering RNA  
SPT : serine palmitoyl transferase  
SR : scavenger receptor  
SREBP : sterol regulatory element binding protein

## T

TA : tissu adipeux  
TCR : T cell receptor  
TG : triglycéride  
TGF : transforming growth factor  
TGR : récepteur des acides biliaires couplé aux protéines G  
TGI : tractus gastro-intestinal  
TLR : toll like receptor  
TNF-α : tumor necrosis factor α  
TNFR : TNF-α receptor  
TOFA : 5-(tetradecyloxy)-2-furoic acid  
TRIF : TIR domain containing adapter inducing interferon β

## U-V-Z

UDCA : acide ursodésoxycholique  
VLDL : very low density lipoprotein  
ZO-1 : zona occluden 1

# AVANT-PROPOS

Je me suis intéressée au cours de ma thèse aux complications hépatiques qui sont liées à l'obésité et à l'abus d'alcool. Les lésions hépatiques qui apparaissent au cours de ces abus alimentaires sont regroupées sous le terme d'hépatopathies métaboliques. Les atteintes du foie qui vont apparaître lors de ces hépatopathies vont évoluer de formes peu sévères à sévères pouvant aller jusqu'au cancer du foie. L'augmentation inquiétante de l'obésité et la persistance du nombre de personnes dépendantes à l'alcool a tristement mis ces pathologies sur le devant de la scène ces dernières années. La compréhension des mécanismes responsables de l'évolution des lésions hépatiques vers les formes les plus sévères reste donc un enjeu majeur.

Ma thèse avait pour but de clarifier le rôle des cellules de Kupffer et du microbiote intestinal dans ces hépatopathies métaboliques. Afin d'aborder ces sujets, il semblait nécessaire de redéfinir les connaissances actuelles sur des sujets aussi variés que la cellule de Kupffer et l'immunité du foie, le microbiote intestinal, que ce soit lors de l'obésité ou lors de l'abus d'alcool. Nous verrons cependant que ces deux pathologies partagent un certain nombre de mécanismes communs. Je vais donc dans l'introduction vous présenter le foie, ses fonctions vitales (chapitre I) et son immunité bien spécifique (chapitre II), les maladies du foie (chapitre III) mais également décrire et comparer plus en détails les hépatopathies liées à l'obésité ou NAFLD (chapitre IV) et les hépatopathies liées à l'abus d'alcool ou MAF (chapitre V). Le dernier chapitre (chapitre VI) sera consacré au microbiote intestinal dont le rôle dans les hépatopathies métaboliques est désormais connu et qui représente actuellement une voie de recherche pour le développement de nouvelles cibles thérapeutiques.



## INTRODUCTION



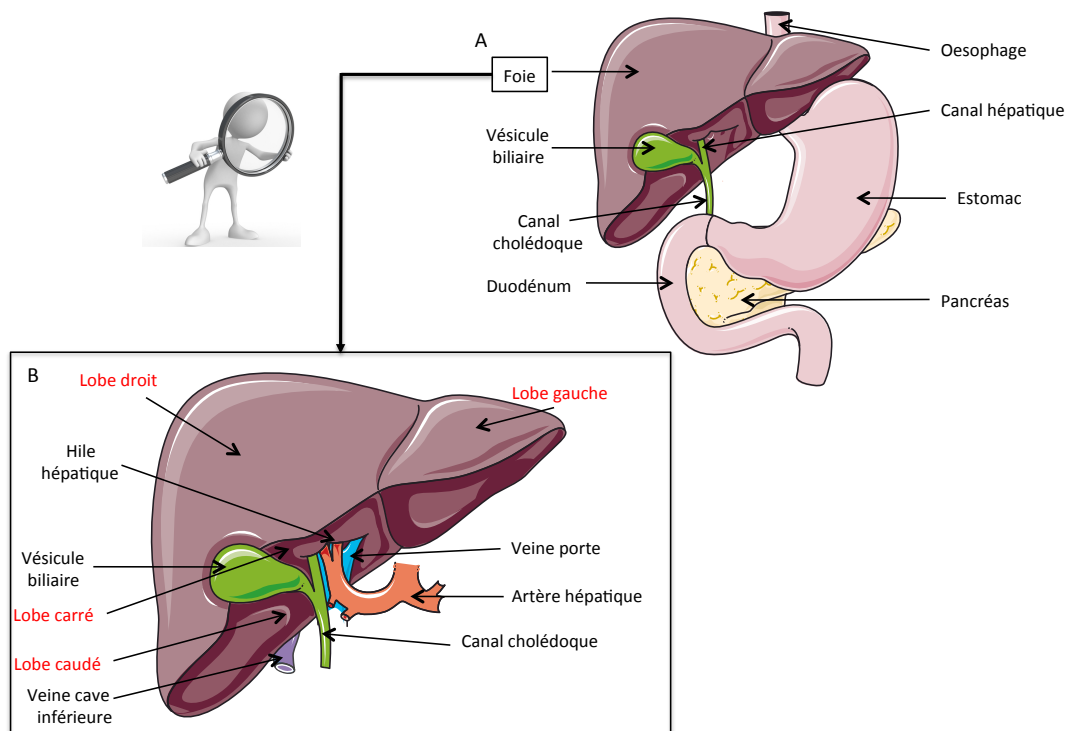


# Chapitre I. Le foie : anatomie, fonction, cellules

Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme et sans doute le plus complexe d'un point de vue métabolique. Grâce à une anatomie spécifique, en particulier une double vascularisation, le foie assure des fonctions aussi variées que le drainage intestinal ou la production de facteurs de coagulation.

## I.1. Anatomie du foie

Le foie est situé dans la cavité péritonéale, localisé à droite de l'estomac, au-dessus du duodénum et de l'angle colique droit. D'un point de vue anatomique, le foie est constitué de quatre lobes inégaux dont deux lobes majeurs : le lobe hépatique droit, qui est le plus volumineux et le lobe hépatique gauche. Entre ces deux lobes majeurs, on distingue le lobe carré et le lobe caudé, qui sont séparés par un sillon appelé le hile du foie. C'est au niveau de ce hile que la veine porte et l'artère hépatique pénètrent dans le foie et que passent les canaux biliaires majeurs (figure 1).



**Figure 1 : Anatomie du foie**

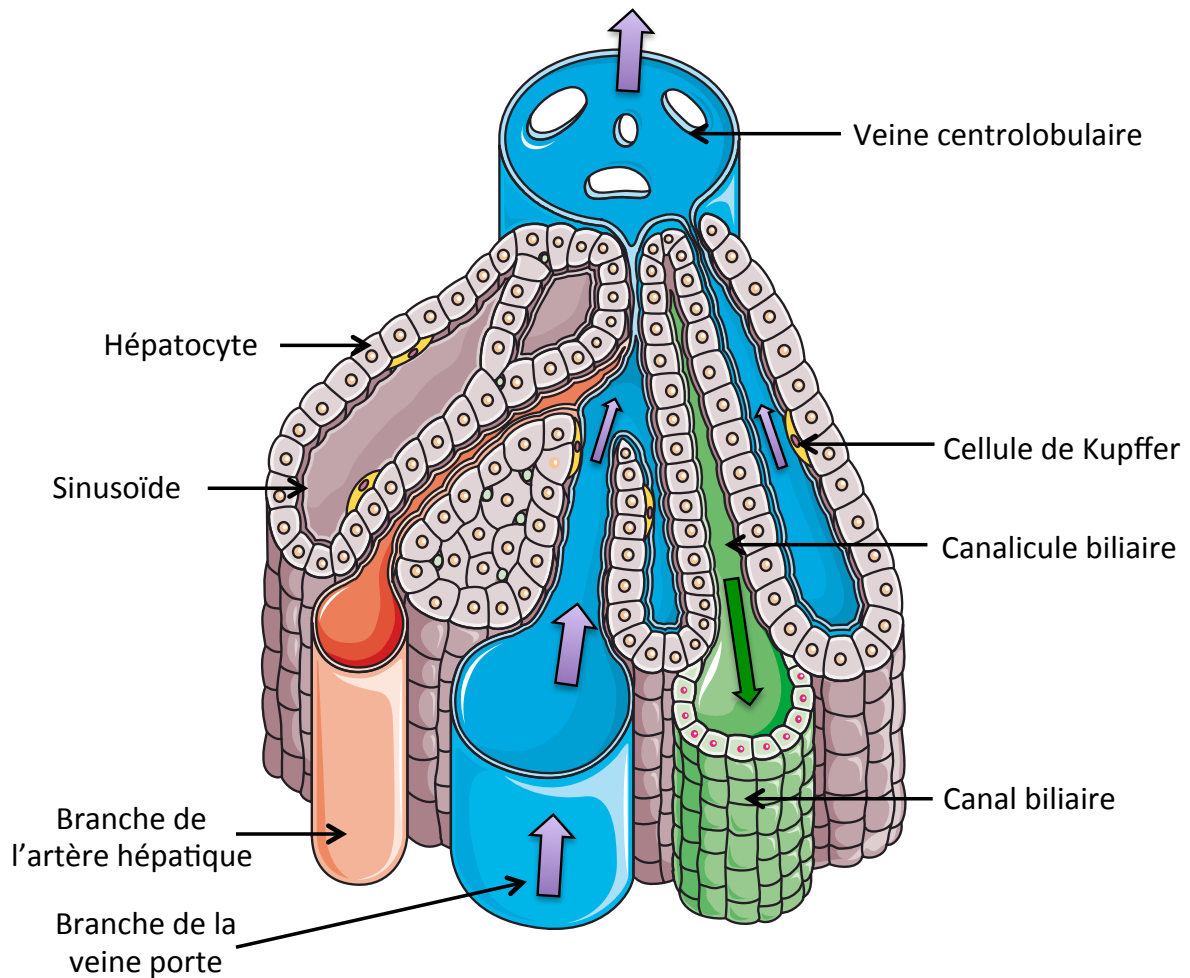
Cette figure décrit l'emplacement du foie dans le système digestif (A), ainsi que l'anatomie plus précise du foie (B) : les lobes sont désignés en rouge, la vésicule biliaire est représentée en vert, la veine cave en violet, la veine porte en bleu et l'artère hépatique en rouge.

Le foie, traversé par 1,5 litre de sang en moyenne à chaque minute de la vie pour un adulte, est un des organes les plus densément vascularisé du corps humain. A lui seul, il monopolise plus de 10 % du volume sanguin total du corps. Cette importante vascularisation se distingue essentiellement par l'existence d'une double vascularisation, unique au foie. En effet, le foie reçoit d'une part le sang artériel provenant de l'artère hépatique qui contient le sang oxygéné et représente 25 % du débit sanguin hépatique. D'autre part, le foie reçoit le sang veineux provenant du tube digestif via la veine porte et représente donc 75 % du débit sanguin hépatique.

Cette double vascularisation, sang artériel et sang veineux, arrive au niveau des capillaires hépatiques. Après des échanges avec les cellules hépatiques, le sang emprunte un réseau de veines de plus en plus larges, jusqu'aux trois veines sus-hépatiques qui quittent le foie et se jettent dans la veine cave inférieure.

La vésicule biliaire est attachée au foie à la limite du lobe carré et du lobe hépatique droit. L'arbre biliaire, qui est l'ensemble du réseau de voies biliaires permettant la formation et le transport de la bile jusqu'à l'intestin, comporte une partie intra et une partie extra-hépatique. Les voies biliaires intra-hépatiques permettent de recueillir la bile sécrétée par les hépatocytes au niveau de chaque lobule hépatique dans l'ensemble des canaux biliaires. Les canaux vont former un canal hépatique commun, qui devient extra-hépatique. Le canal extra-hépatique se joint au canal cystique pour former le canal cholédoque qui va jusqu'au duodénum. Dans l'intestin, la bile est utilisée pour la digestion. Stockée dans la vésicule biliaire sous forme concentrée, elle est déversée dans l'intestin lors des repas via l'ouverture du sphincter d'Oddi.

La double vascularisation du foie ainsi que l'architecture des voies biliaires s'organisent avec les hépatocytes en constituant les unités fonctionnelles du foie que sont les lobules hépatiques. Les lobules hépatiques, de forme hexagonale, sont constitués d'hépatocytes disposés en lames (figure 2).



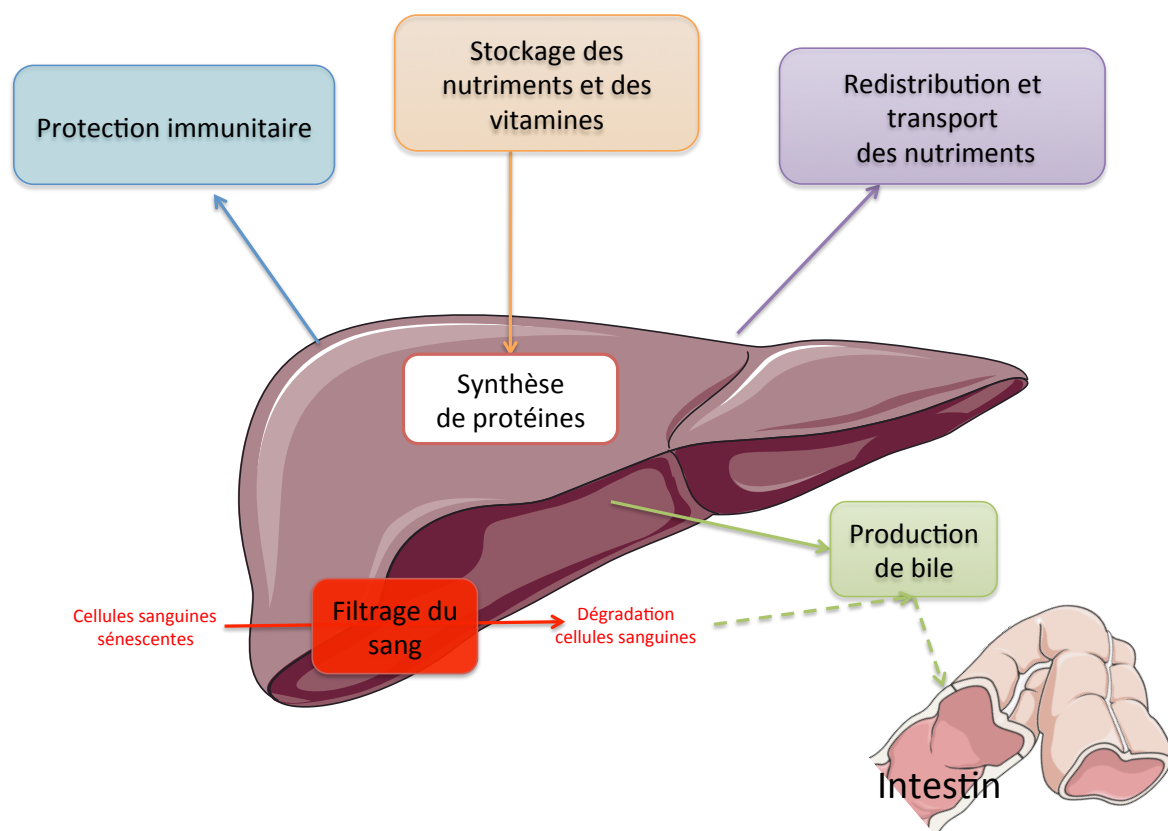
**Figure 2 : Organisation et vascularisation d'un lobule hépatique**

*Schéma de l'organisation d'un lobule hépatique où l'on peut voir l'emplacement des cellules hépatiques (hépatocytes, cellules de Kupffer), des embranchements vasculaires (canal biliaire, artère hépatique, veine porte). La circulation vasculaire est indiquée par des flèches : les flèches violettes symbolisent la trajectoire du sang, circulation centripète et la flèche verte symbolise la trajectoire de la bile, circulation centrifuge.*

Le centre du lobule hépatique est occupé par la veine centrolobulaire qui rejoindra les veines sus-hépatiques quittant le foie. Inversement, le sang artériel, le sang portal et les canaux biliaires s'organisent en triade, appelée espace porte, aux angles du lobule hépatique hexagonal. Ainsi, entre les travées hépatocytaires nous trouvons d'une part, les capillaires sinusoides dans lesquels la circulation est centripète, des espaces portes jusqu'à la veine centrolobulaire. D'autre part, nous retrouvons les canalicules biliaires ayant une circulation centrifuge et permettant à la bile de rejoindre le canal biliaire présent dans l'espace porte.

## I.2. Fonctions hépatiques

Cette anatomie exceptionnelle va permettre au foie d'assurer ses multiples fonctions. En effet, en plus d'être l'organe le plus volumineux, 1,5 kg en moyenne chez un individu adulte, le foie assure de nombreuses fonctions vitales de l'organisme. Travaillant 24 heures sur 24, le foie est un organe qui tient un rôle physiologique essentiel dans l'organisme. Ses fonctions qui vont de la gestion métabolique des nutriments à la synthèse de vitamines sont énumérées ci-dessous (figure 3).



**Figure 3 : Schéma des différentes fonctions assurées par le foie**

*Le foie est au centre de nombreuses fonctions essentielles à l'organisme. Le foie participe aux métabolismes lipidique et glucidique en synthétisant des protéines, en redistribuant et transportant les nutriments, ou en les stockant selon les besoins. Il participe aussi à la détoxification de l'organisme, notamment en éliminant les cellules sanguines sénescents et en produisant la bile, produite de la dégradation des déchets métaboliques (cholestérol, bilirubine ...). Pour finir, le foie participe activement à la protection immunitaire, en maintenant une tolérance hépatique.*

### ***1.2.1. La synthèse et la redistribution des nutriments***

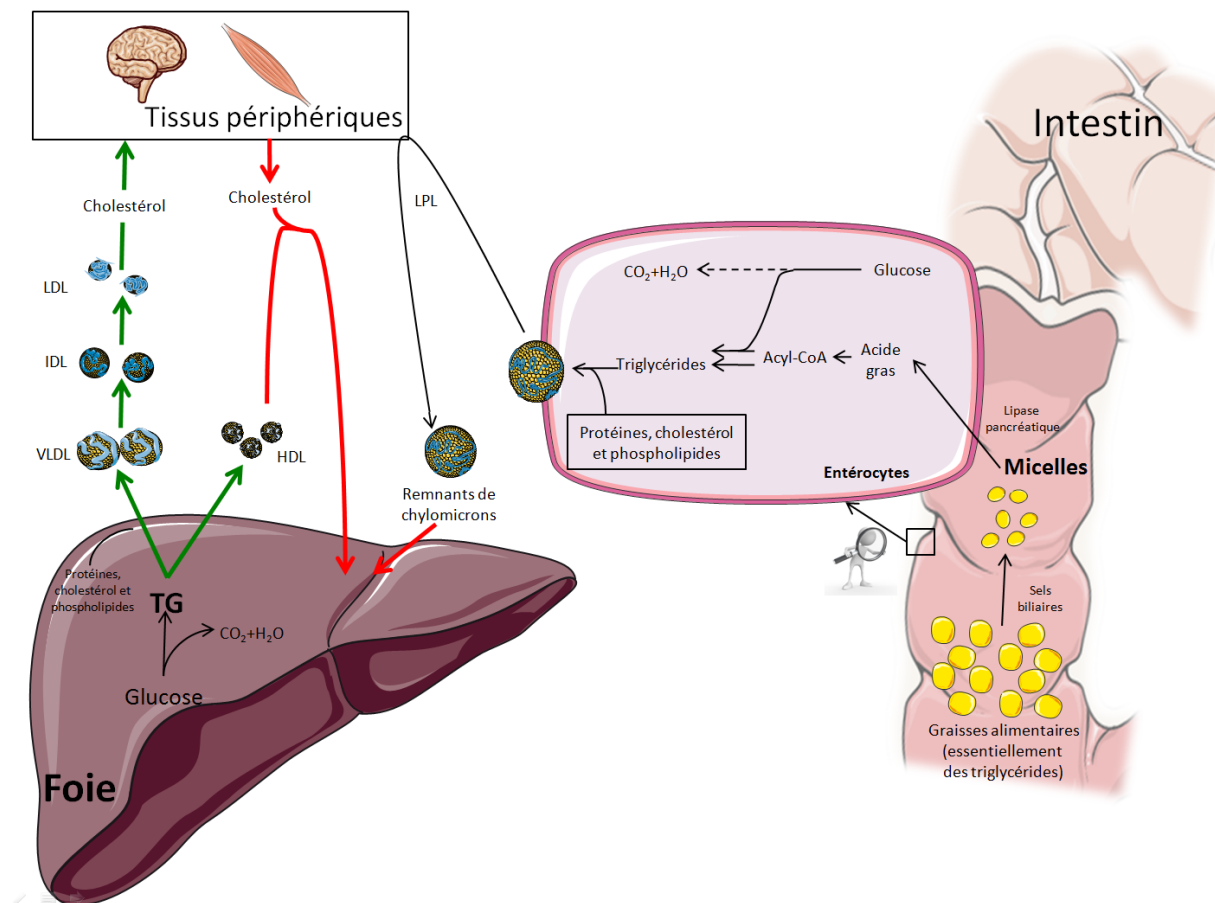
Le foie tient une place essentielle dans les métabolismes glucidique et lipidique mais également dans le métabolisme protéique. Ses différentes fonctions anaboliques et cataboliques permettent la redistribution des nutriments ou leur stockage en fonction du statut métabolique de l'organisme.

Dans le métabolisme glucidique, le foie assure le stockage du glucose sous forme de glycogène, via la glycogénèse. La glycogénolyse assure la redistribution du glucose par hydrolyse du glycogène stocké. Par ailleurs, en cas de carence glucidique, le foie est l'organe produisant la plus grande quantité de glucose via la néoglucogénèse à partir des acides aminés.

Ses rôles dans le métabolisme lipidique sont également multiples. Le foie tient une place importante dans la synthèse et le transport des lipides. Il est impliqué dans la synthèse du cholestérol et sa distribution aux organes, et dans la synthèse des acides biliaires. Le foie est également capable, comme le tissu adipeux (TA), de stocker les acides gras sous forme de triglycérides, mécanisme qui va être à l'origine de la stéatose hépatique.

Les lipides alimentaires sont émulsionnés dans la lumière intestinale par les sels biliaires, puis sont hydrolysés sous forme d'acides gras (AG) par la lipase pancréatique afin d'être captés par la cellule intestinale, l'entérocyte. A ce niveau, les AG sont pris en charge par des lipoprotéines, les chylomicrons. Les lipoprotéines sont des complexes associant des protéines plasmatiques, les apolipoprotéines (Apo), avec des lipides. Ce complexe lipidique et protéique se présente sous forme d'une sphère très organisée : en surface on trouve les lipides hydrophiles, telles que les phospholipides et le cholestérol non estérifié et à l'intérieur de la sphère on trouve les lipides plus hydrophobes comme le cholestérol estérifié et les triglycérides centraux. Cette organisation des lipoprotéines permet le transport optimal des lipides aux cellules, notamment le cholestérol.

Ces chylomicrons (amalgame d'Apo-A et -B) sont synthétisés au niveau des entérocytes et s'occupent du transport des lipides de l'intestin grêle vers les organes. Une fois les triglycérides (TG) pris en charge, ces chylomicrons dits natifs quittent la paroi intestinale et vont via la lymphe regagner la circulation générale (figure 4).



**Figure 4 : Métabolisme et transport des lipides**

Les graisses alimentaires sont métabolisées en acides gras pour être captées par les entérocytes (cellules intestinales). Ces acides gras sont pris en charge dans les chylomicrons. En quittant les entérocytes, les chylomicrons rejoignent la circulation générale, et peuvent être captés par les organes, notamment le foie. Les triglycérides (TG) du foie sont aussi pris en charge par des lipoprotéines, les VLDL. Les VLDL (Very Low Density Lipoprotein) servent à la formation des IDL (Intermediate Density Lipoprotein) et LDL (Low Density Lipoprotein). Ces différentes lipoprotéines permettent le transport des lipides, notamment le cholestérol, aux différents tissus périphériques, le transport antérograde (flèches vertes). Le transport rétrograde des lipides au foie (flèches rouges) se fait à partir des remnants ou des lipoprotéines HDL (High Density Lipoprotein).

Une fois libérés dans le sang, ces chylomicrons sont dégradés en acides gras (AG) et en glycérol par la lipoprotéines-lipase plasmatique (LPL) présente dans les membranes cellulaires des tissus périphériques. Les chylomicrons ainsi délestés de grandes quantités de TG sont appelés remnants de chylomicrons. Ces remnants vont circuler vers le foie dans lequel ils vont être pris en charge et restructurés en lipoprotéines. Parmi celles-ci, on retrouve les VLDL (pour l'anglais *Very Low Density Lipoproteins*), qui permettront de former les IDL (pour l'anglais *Intermediate Density Lipoproteins*), puis des lipoprotéines à faible densité, les LDL (pour l'anglais *Low Density Lipoproteins*).

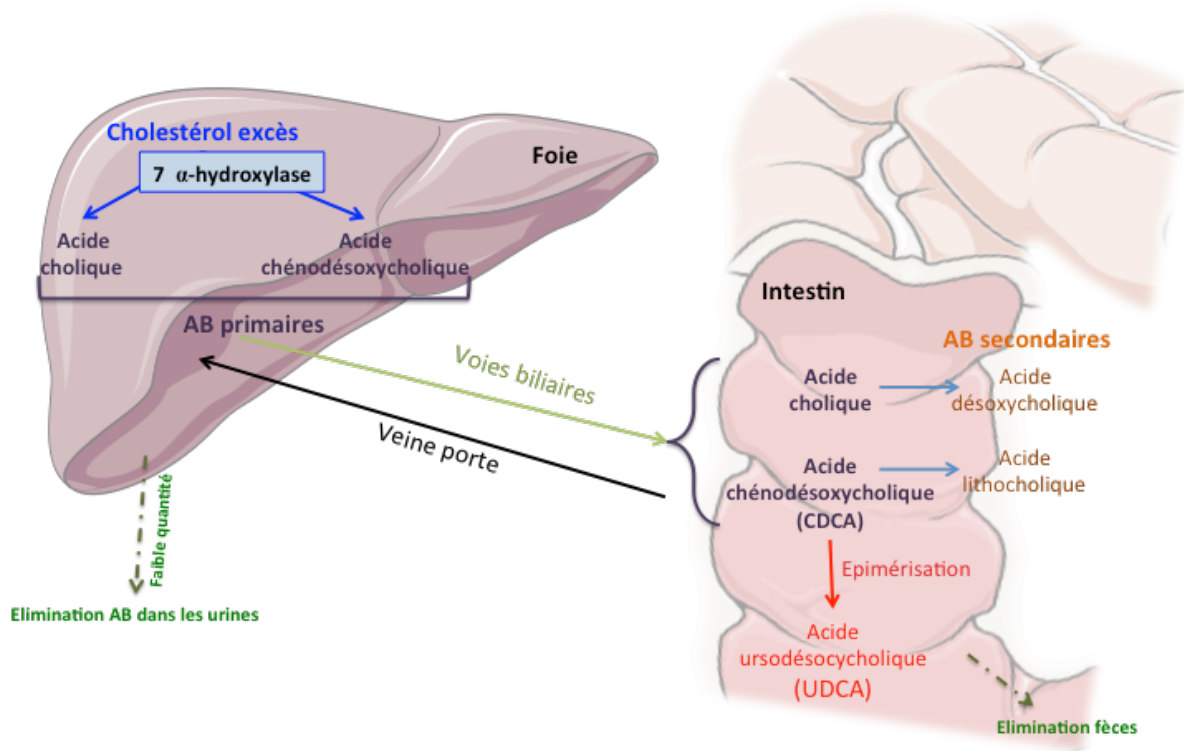
Les LDL, contenant les Apo-B, -C et -E, ont un rôle de transport antérograde du cholestérol (libre ou estérifié) du foie vers le sang et à travers le corps pour les apporter aux cellules (1). Une fois libéré dans les cellules par endocytose, le cholestérol a plusieurs fonctions. Il a entre autre un rôle architectural car il rentre dans la composition des radeaux lipidiques de la membrane cellulaire. Les lipoprotéines ainsi délestées de cholestérol voient leur densité modifiée. Les HDL (pour l'anglais *High Density Lipoproteins*) contenant les Apo-A, -C et -E, vont ensuite se charger du transport rétrograde des lipides vers le foie.

Il faut noter que si l'alimentation apporte 25 % environ du cholestérol dont un organisme a besoin, les 75 % restants sont synthétisés par le foie. Cette synthèse hépatique s'effectue au niveau du cytoplasme des cellules, à partir de trois Acétyl-CoA venant des péroxysomes pour former de l'hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA). L'HMG-CoA est ensuite réduit sous l'action de l'enzyme HMG-CoA réductase.

Les hypercholestérolémies familiales sont généralement liées à des mutations des gènes du récepteur aux LDL, le LDLR (pour l'anglais, *LDL Receptor*) et entraînent des anomalies au niveau de la production ou de la structure des LDLR. Or les cellules du foie dépendent de ces LDLR pour capter le LDL-cholestérol de la circulation et permettre sa dégradation via la bile. Ce défaut de recyclage du foie via le LDLR est une cause majeure d'hypercholestérolémies.

Les acides biliaires (AB) sont les produits du catabolisme du cholestérol qui se déroule dans le foie. Le cholestérol en excès rapatrié par les HDL, est dégradé en acides biliaires dans les hépatocytes par la 7- $\alpha$ -hydroxylase. Le cholestérol lui-même et les acides biliaires sont excrétés dans la bile vers l'intestin via les voies biliaires ; tous sont fortement réabsorbés mais une petite partie est éliminée dans les fèces (figure 5).





**Figure 5 : Cycle entéro-hépatique des acides biliaires**

Les acides biliaires (AB) sont les produits du catabolisme du cholestérol. Le cholestérol est dégradé en AB primaires (acide cholique et acide chénodésoxycholique) par la 7- $\alpha$ -hydroxylase. Ces AB primaires vont dans l'intestin via les voies biliaires où ils peuvent être transformés en AB secondaires (respectivement acide désoxycholique (CDCA) et lithocholique). Le CDCA peut être épimérisé dans l'intestin pour donner l'acide ursodésoxycholique. Ces AB peuvent retourner dans le foie via la veine porte. De faibles quantités d'AB primaires ou secondaires sont éliminées dans les fèces ou les urines.

Les AB primaires (cholique et chénodésoxycholique) issus de la dégradation du cholestérol sont conjugués dans le foie. Ces AB primaires conjugués, ou sels biliaires, sont excrétés dans la bile vers l'intestin. Dans l'intestin, la bile permet l'émulsion des graisses en micelles permettant l'action de la lipase pancréatique (figure 4) et aussi l'absorption des vitamines liposolubles dans le duodénum et le jéjunum. Dans l'iléon, sous l'action des bactéries intestinales, les sels biliaires sont déconjugués puis transformés. L'acide cholique est partiellement transformé en acide désoxycholique et l'acide chénodésoxycholique (CDCA) en acide lithocholique. Ces AB sont dits secondaires. Le CDCA peut aussi être épimérisé pour donner l'acide ursodésoxycholique (UDCA).

Les AB primaires et secondaires sont réabsorbés dans l'iléon et transportés par la veine porte vers le foie. Cette voie métabolique est le cycle entéro-hépatique des acides biliaires.

Le rôle du foie dans le métabolisme des protéines est également essentiel à l'homéostasie de l'organisme. Il s'occupe de la majorité des synthèses des protéines plasmatiques de l'organisme. D'une part, le foie assure la synthèse de la majorité des facteurs de la coagulation tels que le fibrinogène, la prothrombine, ou encore la thromboplastine mais également des facteurs anticoagulants comme l'antithrombine et la protéine C. D'autre part, le foie synthétise d'autres protéines plasmatiques telles que l'albumine, les protéines de la phase aigüe de l'inflammation ou encore les protéines du métabolisme du fer, la transferrine et la ferritine. En effet, le fer provenant des entérocytes (5 %) et le fer provenant de l'hémolyse (95 %) sont pris en charge par la transferrine. Cette molécule transporteuse distribue le fer vers les lieux d'utilisation, principalement la moelle osseuse et des lieux de stockage notamment le foie.

Enfin, le foie participe à la synthèse d'hormones comme l'érythropoïétine et la thrombopoïétine qui sont des facteurs de croissance permettant de stimuler respectivement la formation des précurseurs des érythrocytes et des plaquettes.

### ***1.2.2. Le stockage***

Comme nous venons de le voir, les fonctions anaboliques du foie en font un organe de stockage précieux, un véritable réservoir de carburants.

Le foie stocke le glucose, source universelle d'énergie, sous forme de glycogène et le met à la disposition de l'organisme en cas de besoin. Les lipides parvenant au foie sont transformés en triglycérides et stockés dans les cellules hépatiques et deviennent une source d'énergie majeure lors du jeûne. En effet, en réponse aux besoins énergétiques du corps, ces TG peuvent être dégradés et divisés en acides gras et utilisés. Le revers de la médaille, nous le verrons plus loin, est qu'un stockage trop important va provoquer une stéatose.

En plus de cette réserve d'énergie stockée, le foie emmagasine également des vitamines solubles telles que les vitamines A, B, D et K. Par ailleurs, lors de l'élimination des globules rouges, le foie met également en réserve du cuivre et du fer grâce à la transferrine qu'il synthétise.

### ***1.2.3. Détoxification et protection immunitaire***

Recevant environ 1,5 litre de sang par minute, le foie a un rôle de filtre : il récupère ce qui est utilisable par notre corps, comme nous l'avons vu dans le paragraphe sur les redistributions des nutriments, et transforme les substances toxiques en produits inoffensifs avant de les éliminer.

Le foie intervient notamment dans l'élimination des globules rouges sénescents considérés par l'organisme comme des éléments toxiques. En effet, les macrophages résidents du foie, les cellules de Kupffer (KC), sont capables de détecter les signaux de sénescence des érythrocytes et ainsi d'entraîner leur phagocytose et leur dégradation. Lors de cette dégradation, du fer héminique et de la bilirubine sont libérés. Ce fer libéré est soit mis en réserve dans le foie en s'associant à la ferritine, soit recyclé rapidement par la ferroportine, un exportateur membranaire synthétisé par les KC, qui le transfère dans le plasma. Dans la circulation, ce fer est capté par la transferrine qui le distribue aux différents organes. Le foie synthétise également l'hepcidine, un peptide circulant qui en inhibant la ferroportine, permet la régulation négative de l'absorption et du recyclage du fer héminique. Une défaillance héréditaire au niveau de ces peptides entraînera une maladie hépatique de type hémochromatose dont nous détaillerons les aspects dans le chapitre III.

La bilirubine libérée par la dégradation des érythrocytes est, quant à elle, extrêmement toxique tant qu'elle n'est pas transformée en bilirubine conjuguée. Le foie assure donc sa conjugaison et son élimination via la bile.

Le foie participe aussi au catabolisme protéique, c'est à dire à la dégradation des protéines. En effet, les groupements azotés des acides aminés se dégradent sous forme d'ammoniac au niveau rénal. Le foie se charge d'éliminer via le cycle de l'urée cet ammoniac qui est potentiellement toxique. L'urée issue de ce cycle est ensuite éliminée par les urines.

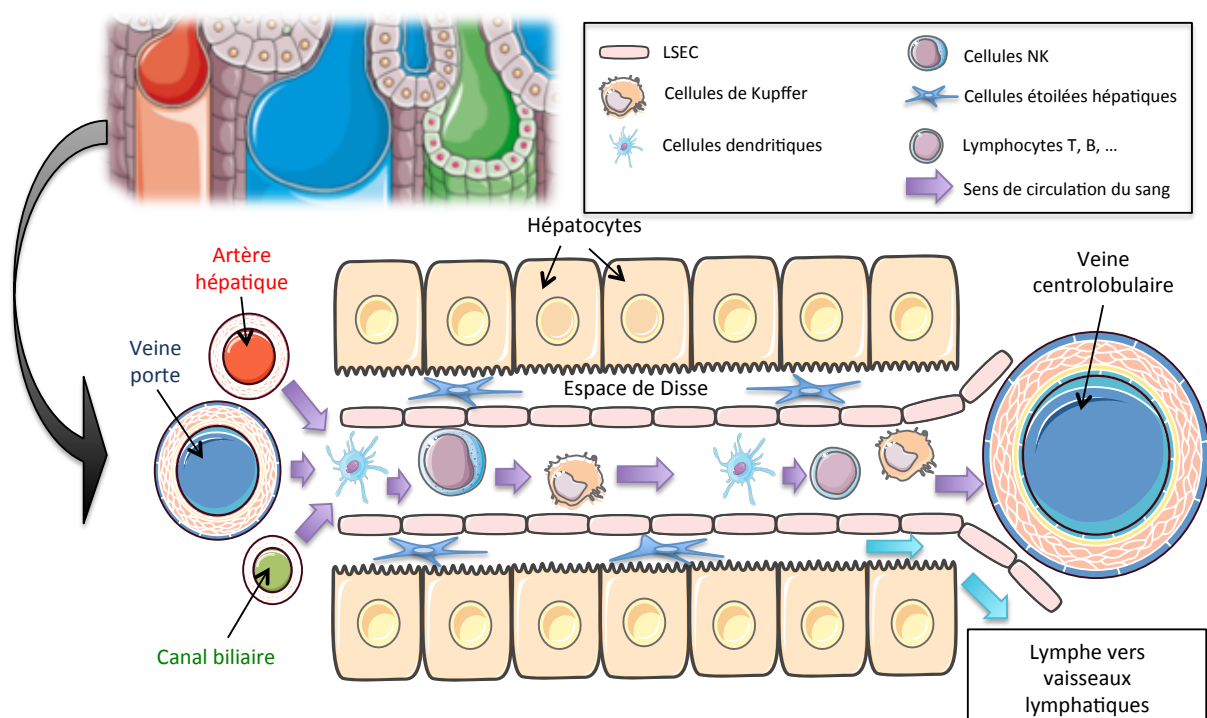
Le foie est aussi la première ligne de défense contre les organismes pathogènes (particules et bactéries circulantes, endotoxines provenant de l'alimentation) ayant réussi à franchir la barrière intestinale. Cette protection s'exerce notamment grâce à la population des KC dont nous traiterons plus en détail dans le chapitre II.

### I.3. Cellules du foie

Pour assurer toutes ses fonctions, le foie est constitué d'hépatocytes mais également d'autres cellules assurant chacune des fonctions différentes. Outre les hépatocytes, nous retrouvons au niveau hépatique les cellules endothéliales, les cellules étoilées, les cellules ovales et de nombreuses cellules de l'immunité.

#### I.3.1. Les hépatocytes

Les hépatocytes représentent 70 à 80 % des cellules hépatiques et forment ce que l'on appelle le parenchyme hépatique. Les travées hépatocytaires sont bordées par les sinusoides hépatiques constituées par les cellules endothéliales hépatiques (2). C'est entre cette barrière endothéliale et la travée hépatocytaire que l'on localise l'espace de Disse. L'espace de Disse constitue la zone d'échange entre le sang circulant et les hépatocytes. Dans cette espace de Disse va siéger bon nombre de cellules immunitaires (figure 6).



**Figure 6 : Localisation des cellules au sein du parenchyme hépatique**

Les hépatocytes sont organisés en travées entre lesquelles le sang circule lentement vers la veine centrolobulaire (flèches violettes). Les sinusoides sont délimités par une couche discontinue de cellules, les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques (LSEC). Ces LSEC sont séparées des hépatocytes par l'espace de Disse, zone où les hépatocytes interagissent avec le sang circulant qui contient les cellules immunitaires (cellules dendritiques, cellules NK, lymphocytes T ...), qui seront drainées par le système lymphatique.

### ***1.3.2. Les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques***

Les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques, LSEC (pour l'anglais *Liver Sinusoidal Endothelial Cell*) qui constituent la paroi des sinusoides, ont la particularité de former un endothélium peu étanche contrairement à un endothélium classique. Cet endothélium, dit fenestré, permet le passage de nombreuses substances, en outre des nutriments essentiels mais également des éléments pouvant être toxiques. Ces LSEC sont aussi capables de transporter, par endocytose, de nombreuses macromolécules et en particulier les lipoprotéines VLDL, HDL, et LDL.

Les LSEC ont également la particularité unique de traitement et de présentation d'antigène, leur donnant les caractéristiques de CPA (*Cellules Présentatrices d'Antigènes*), dénommées alors « CPA-like ». Cette captation d'antigènes génère la production de molécules de signalisation de l'immunité, cytokines et chimiokines. Les LSEC participent donc ainsi à l'immunité du foie comme nous y reviendrons plus loin.

### ***1.3.3. Les cellules étoilées hépatiques***

Les CEH (*Cellules Etoilées hépatiques*) sont aussi appelées cellules stellaires ou plus anciennement cellules d'Ito ou Iyocytes. Elles représentent 5 à 8 % des cellules hépatiques et sont retrouvées au sein du parenchyme hépatique.

Les CEH sont essentielles à la régénération hépatique et produisent des composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène, des protéoglycanes, la laminine mais aussi les substances de dégradation de cette matrice. Ces CEH sécrètent aussi des facteurs de croissance comme le facteur de croissance des plaquettes, le PDGF (pour l'anglais *Platelet Derived Growth Factor*) et des cytokines comme le TGF- $\beta$  (pour l'anglais *Tumor Necrosis Factor  $\beta$* ) qui sont impliqués dans la fibrogenèse.

Les CEH que l'on peut retrouver sont, soit activées, stade durant lequel elles assurent le renouvellement de la matrice extracellulaire, soit quiescentes, stade auquel elles s'occupent de l'homéostasie de la vitamine A. En effet, les CEH quiescentes sont capables de stocker de la vitamine A dans leurs branches cytoplasmiques et assurent son relargage dans les sinusoides selon les besoins de l'organisme.

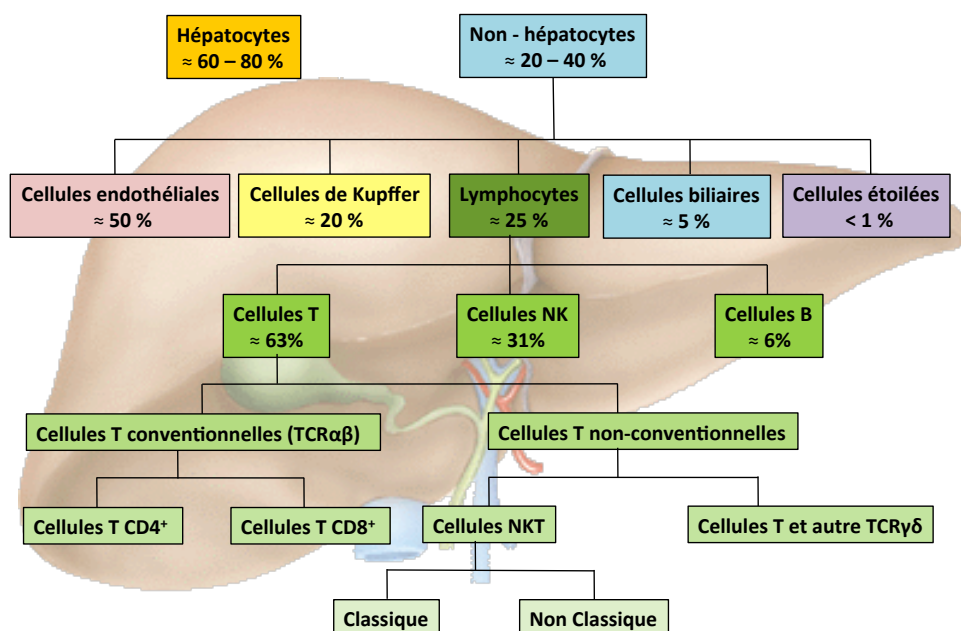
D'autres cellules du foie sont recensées mais leur rôle est pour l'instant moins bien connu. Parmi celles-ci, nous avons les cellules souches pluripotentes nommées cellules ovales. Ces cellules dérivant de précurseurs intra-hépatiques ont une fonction de régénération des hépatocytes et des cellules endothéliales. Ces cellules ovales sont capables de se différencier en hépatocytes ou en cellules épithéliales du canal biliaire. Ces propriétés de différenciation font de ces cellules des atouts majeurs dans la régénération hépatique que nous ne détaillerons pas plus mais qui sont clairement décrit dans une revue récente (3).



## Chapitre II. Immunité du foie

Le foie, en drainant le sang portal provenant du tube digestif, est potentiellement exposé à des antigènes provenant de l'alimentation, des bactéries pathogènes ou des fragments de bactéries pathogènes, voire à des bactéries commensales provenant de la flore intestinale comme nous y reviendrons dans le chapitre VI. La nécessité d'une réglementation immunitaire stricte est obligatoire pour éviter une réponse immunitaire générale au moindre antigène alimentaire. Ainsi, le foie dispose d'une immunité spécifique le rendant capable de maintenir une tolérance immunitaire vis à vis des antigènes intestinaux tout en étant apte à ériger une première ligne de défense locale contre ces agresseurs.

Le foie possède une proportion plus élevée de cellules intervenant dans l'immunité innée, leur rôle est d'éviter tout déclenchement immunitaire inapproprié. Environ 45 % des cellules non hépatocytaires sont des cellules immunitaires. On retrouve notamment des lymphocytes (T, B ou NKT) et des cellules NK qui représentent environ 25 % des cellules non parenchymateuses, des macrophages résidents, les cellules de Kupffer, qui représentent environ 20 % des cellules non parenchymateuses à elles seules (figure 7) (2).



**Figure 7 : Répartition des populations cellulaires du foie**

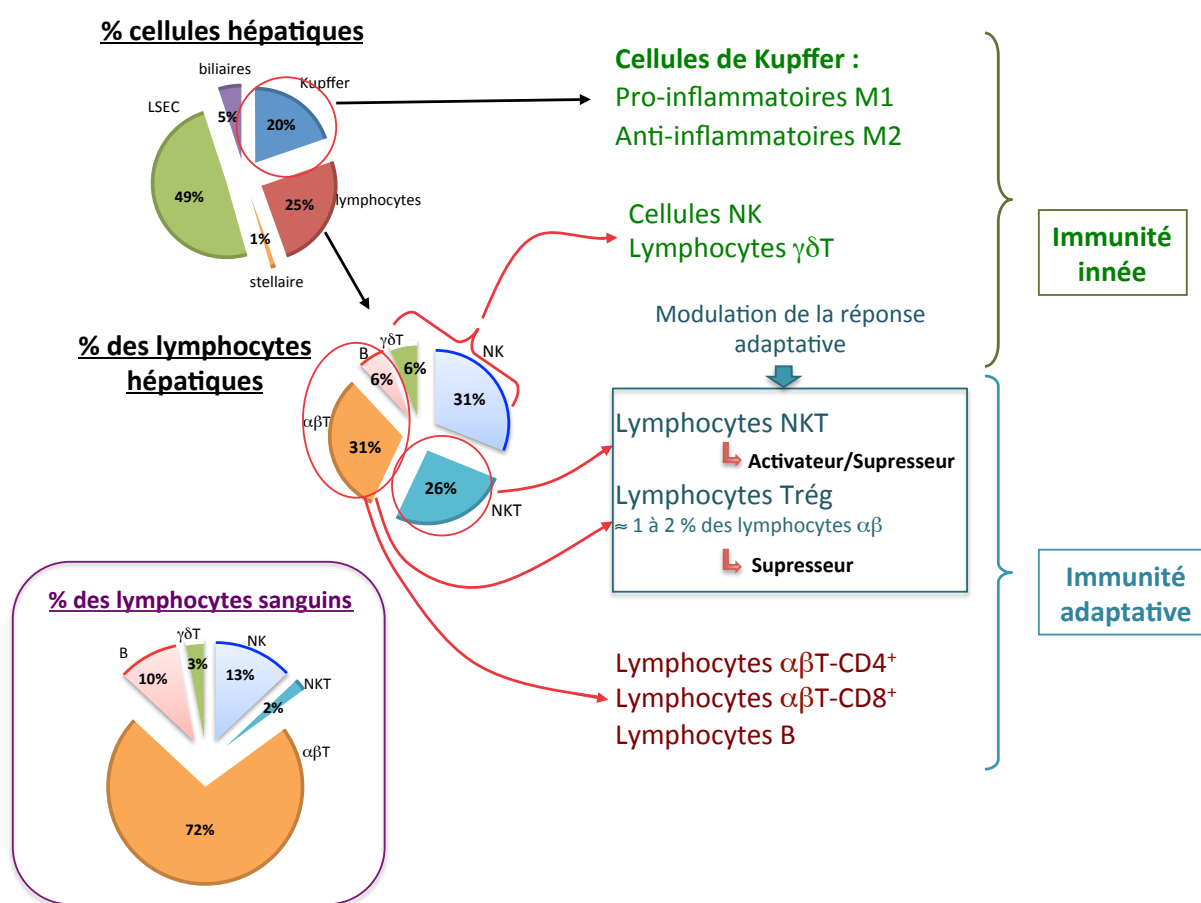
Répartition de la proportion des différentes cellules du foie entre les cellules hépatocytaires et les cellules non hépatocytaires. Les cellules non hépatocytaires se répartissent entre les cellules endothéliales, les cellules de Kupffer, les différents lymphocytes, les cellules biliaires et les cellules étoilées. Adapté de Racanelli et al., 2006 (2).



## II.1. Les lymphocytes intra-hépatiques

Les lymphocytes sont principalement localisés au niveau des espaces portes et dans les zones péri-sinusoïdales, mais peuvent être recrutés au sein du parenchyme hépatique et former des infiltrats inflammatoires en cas d'agression.

Au niveau sanguin, les lymphocytes T conventionnels ( $CD4^+$  et  $CD8^+$ ) sont majoritaires et représentent 72 % des lymphocytes circulants. Au niveau hépatique, ces lymphocytes T représentent seulement 31 % des lymphocytes totaux (figure 8) (4).



**Figure 8 : Distributions des populations immunitaires dans le foie et le sang humain**

Répartitions des cellules et lymphocytes hépatiques comparées à la répartition des lymphocytes sanguins (encadré violet). Les cellules immunitaires ont été classifiées à droite selon leur appartenance au système de l'immunité innée (cellules de Kupffer, lymphocytes NK, NKT,  $\gamma\delta T$ ), ou adaptative (lymphocytes  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ , NKT, Trég et B).

Les cellules T non conventionnelles englobent les lymphocytes NKT qui expriment le marqueur des cellules NK et les lymphocytes  $T\gamma\delta$ , qui ne l'expriment pas.

Les lymphocytes NKT sont abondants au niveau du foie comparativement aux autres organes avec une présence de 26 % des NKT parmi les lymphocytes intra-hépatiques contrairement au sang où ils ne représentent que 2 % des lymphocytes. Les lymphocytes NKT font aussi partie du système immunitaire inné et jouent un rôle important dans la défense contre l'infection ou dans l'inflammation hépatique. En fonction de la nature de l'antigène reçu, les lymphocytes NKT ont la capacité d'avoir une réponse rapide face à une stimulation et sont capables de sécréter des cytokines inflammatoires de type Th1 ou Th2 (5).

Les lymphocytes  $T\gamma\delta$  sont également doublés dans le foie. En effet, 6 % des  $T\gamma\delta$  sont retrouvées dans le foie alors qu'ils ne représentent que 3 % dans le sang. Ils semblent jouer un rôle important dans les défenses contre les infections virales et bactériennes et contre la formation des tumeurs (5).

Les cellules NK représentent un élément crucial du système immunitaire inné, elles jouent un rôle important dans l'immunité antivirale et anti-tumorale. Elles sont impliquées dans les réponses immunitaires innées contre des virus, des tumeurs, des bactéries intracellulaires et les parasites (5). Chez l'Homme, cette population est triplée au niveau du foie (31 %) comparativement à sa représentation sanguine (13 %). Comme les lymphocytes NKT, les cellules NK peuvent orienter leur réponse immunitaire grâce au panel de récepteurs activateurs ou inhibiteurs qu'elles possèdent et peuvent activer ou refreiner leur activité cytotoxique.

Cet équipement de lymphocytes intra-hépatiques a donc pour but de contraindre le foie à une réponse rapide et essentiellement locale face à une stimulation immunitaire qui peut être récurrente du fait de la liaison quasi directe avec le système digestif.

## II.2. Les cellules présentatrices d'antigènes hépatiques

Le foie possède également un équipement de cellules résidentes immunitaires capables de capturer et de présenter des antigènes lorsqu'ils arrivent au niveau du foie, ou lorsque des endotoxines sont libérées lors de la mort des hépatocytes infectés par des pathogènes. Ces cellules présentatrices d'antigènes (CPA) hépatiques sont les LSEC, les cellules dendritiques (DC, pour l'anglais *Dendritic Cells*) et les KC. Ces CPA ont un rôle crucial pour la maintenance de la tolérance dans des conditions non-inflammatoires (6).

Les LSEC dont nous avons déjà parlé qui forment l'endothélium fenestré des sinusoides hépatiques ont également un rôle immunitaire. En effet, leur position les met en contact continu avec les antigènes, antigènes alimentaires ou organismes pathogènes. De ce fait, les LSEC présentent un panel de récepteurs capables de reconnaître les antigènes, incluant des récepteurs scavengers qui reconnaissent les lipoprotéines LDL oxydées. Outre ces fonctions de captation, les LSEC peuvent avoir une fonction de CPA-like dans la mesure où elles expriment à leur surface les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Elles sont donc capables d'apprêter et de présenter des antigènes via le CMH-I aux cellules T. Les LSEC expriment également des molécules de co-stimulation telles que le CD40, CD80 et le CD86 qui vont permettre d'assurer l'activation des lymphocytes T suite à la présentation de l'antigène. Il a cependant été observé que les LSEC humaines n'expriment pas de façon constitutive les molécules de co-stimulation CD80 et CD86, rendant inadéquate l'activation des cellules T. Néanmoins, leur expression serait stimulée lors d'une réponse inflammatoire (7).

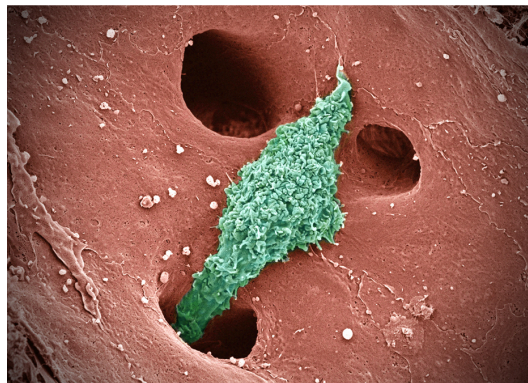
Les cellules dendritiques ont une capacité à induire une réponse cellulaire T moindre contrairement aux cellules dendritiques des autres organes tels que la rate. Cette particularité est liée à une présence constante d'endotoxines qui participe à la tolérance immune du foie (8). De fait, les DC hépatiques sont majoritairement immatures et expriment peu de molécules de co-stimulation et de CMH-I à leur surface nécessaire à l'activation adéquate des lymphocytes T (9). Lors de leur passage dans les sinusoides hépatiques, les DC interagissent avec les KC afin de faciliter les présentations antigéniques croisées menant à une meilleure induction du système immunitaire contre des pathogènes (10). De plus, les DC

hépatiques ont une activité phagocytaire anormalement faible comparée aux KC et aux LSEC. Seules les DC hépatiques résidentes exprimant la molécule CD8 $\alpha$  seraient phagocytaires (9).

Les cellules dendritiques hépatiques peuvent appartenir à deux populations : les DC myéloïdes (mDC) et les DC plasmocytaires (pDC). Les pDC sont plus abondantes que les mDC dans le foie humain comparé aux autres organes en raison de leur rôle. En effet, les pDC sont des CPA engagées dans l'activation des lymphocytes T et peuvent induire une réponse inflammatoire ou anti-inflammatoire (6). Par ailleurs, les pDC sont une source majeure d'IFN- $\alpha$  (*Interféron- $\alpha$* ), cytokine importante dans le système immunitaire inné. Inversement, les mDC hépatiques sont capables, dans un contexte non pathologique, d'induire la production par les lymphocytes T de cytokines anti-inflammatoires, comme l'IL-10 (11).

### II.3. Les cellules de Kupffer

Les KC sont les macrophages résidents du foie et représentent 20 % des cellules non parenchymateuses. Cette population macrophagique résidente est la plus abondante du corps humain avec 80 à 90 % des macrophages qui sont hépatiques (figure 9) (12).



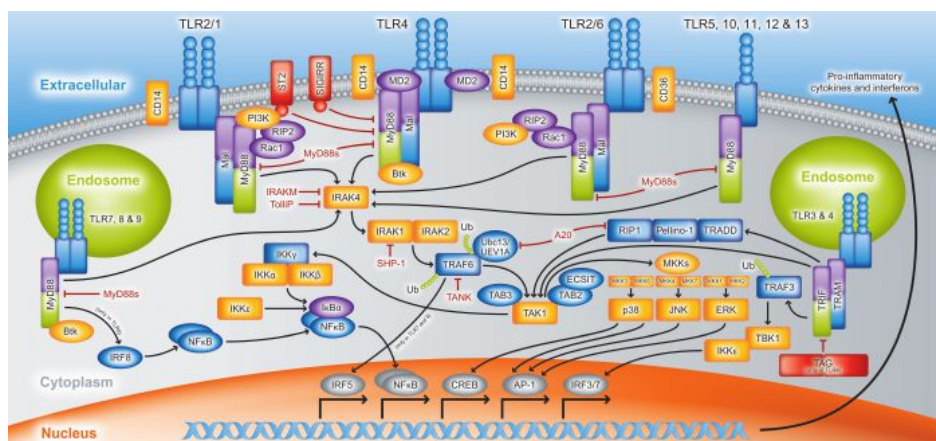
**Figure 9 : Vue d'une cellule de Kupffer entrant dans un sinusöide hépatique**

Image de microscopie électronique à balayage représentant une cellule de Kupffer (en vert) entrant dans un sinusöide (<http://amolecularmatter.tumblr.com>)

### II.3.1. Caractérisation des monocytes/macrophages

Dans le contexte de la réponse immunitaire adaptative, l'environnement cytokinique produit par les lymphocytes T a pour conséquence la polarisation des macrophages. Reflétant la polarisation Th1-Th2 des lymphocytes T, ces macrophages ont été classifiés en deux populations. Les macrophages M1, dits classiques, pour leur profil «pro-inflammatoire» induits par les cytokines de type pro-inflammatoire (Th1), telles que l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  (pour l'anglais *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ) et les macrophages M2, dits alternatifs, pour leur profil « immuno-régulateur » sont induits par les cytokines de type Th2.

La différenciation des macrophages en macrophages M1 se fait par l'IFN- $\gamma$ , ou l'association de l'IFN- $\gamma$  avec d'autres cytokines comme le TNF- $\alpha$  et/ou par des facteurs de croissance comme le GM-CSF (pour l'anglais *Granulocytes Macrophages Colony- Stimulating Factor*) (13). Cependant, le macrophage peut être directement activé par des stimuli microbiens, par exemple les endotoxines. L'activation des macrophages par ces stimuli se fait pour une grande partie par la voie d'activation des récepteurs TLR (pour l'anglais *Toll Like Receptors*). Ces TLR constituent une famille de récepteurs transmembranaires qui sont impliqués dans l'immunité innée (14). Les TLR reconnaissent des motifs structuraux caractéristiques présents à la surface des pathogènes : les PAMP (pour l'anglais *Pathogen- Associated Molecular Patterns*) et sont engagés dans différentes voie de l'immunité (figure 10).



**Figure 10 : Les différentes voies de signalisation des TLR**

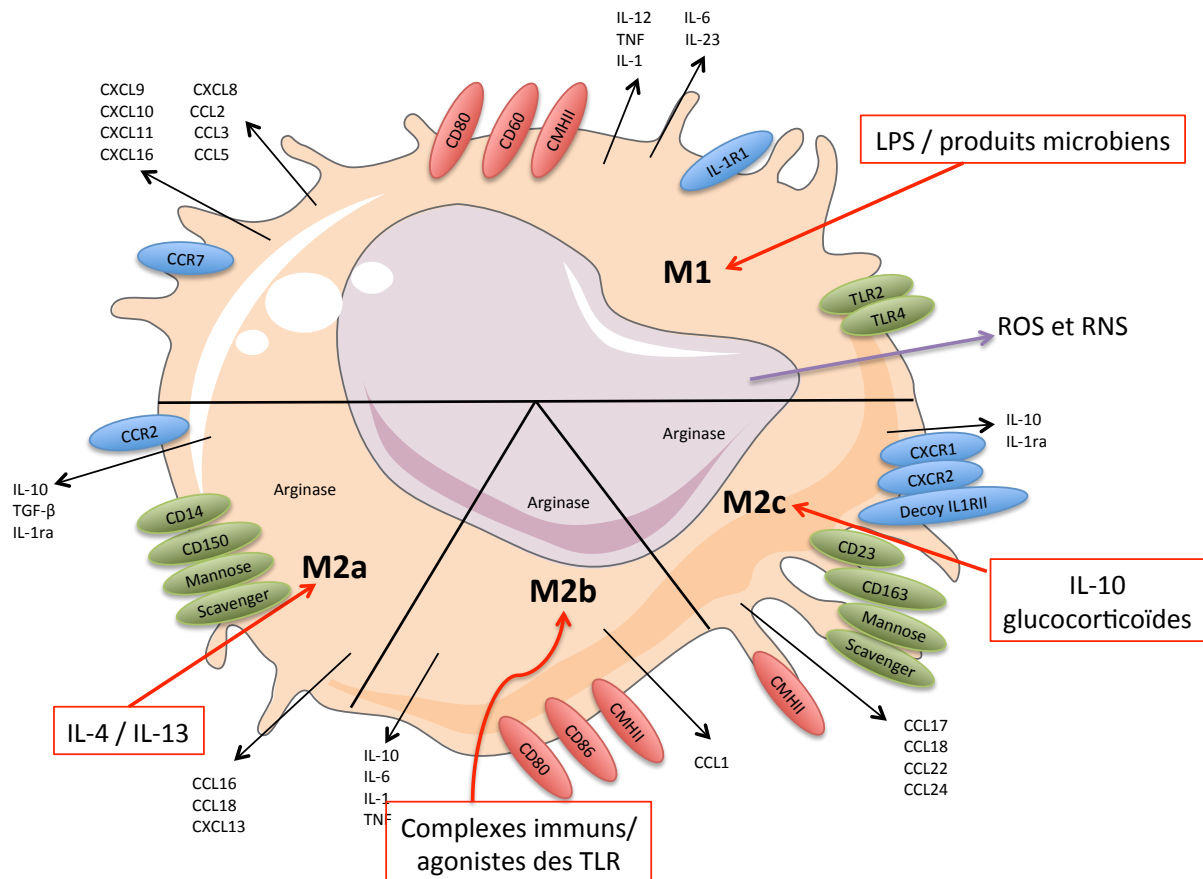
**Schéma des voies de signalisation des TLR.** Ces TLR peuvent être localisés à la membrane cellulaire (TLR 1, 2, 4, 5, 6) ou au niveau des endosomes (TLR 3, 7, 8, 9). Lorsqu'ils s'activent, des voies de signalisation sont activées (Myd88, TRIF, NFκB) et permettent l'expression de gènes codant pour la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Adapté de Abcam.

On retrouve des TLR situés au niveau des endosomes, les TLR 3, 7, 8, 9 qui reconnaissent les composants viraux et bactériens mais surtout les acides nucléiques. Au niveau de la membrane plasmique, on retrouve les TLR 1, 2, 4, 5, 6 qui sont impliqués dans la reconnaissance des composants de la paroi des agents infectieux. On distingue notamment le TLR 5 qui reconnaît la flagelline, protéine de structure des flagelles bactériens et les TLR 1 qui reconnaît le peptidoglycane, le TLR 2, les lipoprotéines et le TLR6, les glycophospholipides. Le TLR 4 reconnaît les lipopolysaccharides (LPS), des endotoxines présentes au niveau des bactéries Gram négative. Nous verrons dans les chapitres suivants que cette voie d'activation des macrophages est impliquée dans l'activation des KC et dans la progression des hépatopathies liée à l'obésité et à la consommation excessive d'alcool.

L'activation des macrophages, qui peut être directe via les PAMP, va entraîner la production de cytokines et de chimiokines qui permettent le recrutement de cellules immunitaires innées telles que les NK et les NKT. Par ailleurs, les KC possèdent aussi des récepteurs scavengers qui activent leur fonction de phagocytose et leur permet de dégrader les LDL oxydés et des récepteurs mannose qui leur permettent de dégrader des bactéries exprimant à leur surface de grandes quantités de mannose.

En plus de leur capacité à produire des cytokines qui polarisent l'immunité vers un profil inflammatoire, les macrophages M1 ont des fonctions effectrices de «macrophages classiques» comme la clairance bactérienne et l'activité antivirale en favorisant la phagocytose des pathogènes. Les TLR des macrophages M1 reconnaissent les motifs sur les pathogènes et activent les voies de signalisation inflammatoires, telles que la voie NFκB (15).

L'identification d'une forme d'activation des macrophages dite alternative ou M2 par l'IL-4 (16), initialement décrit comme « extincteur » de l'activation des macrophages M1, a ouvert de nouvelles perspectives sur la plasticité des phagocytes mononucléaires. L'IL-4 et l'IL-13 ont ainsi été identifiés comme inducteurs des macrophages M2 (15). Il est maintenant connu que d'autres cytokines peuvent induire la polarisation M2 comme l'IL-33 qui est une cytokine de la famille de l'IL-1 associé à la réponse Th2 (17) (figure 11).



**Figure 11 : Polarisation M1/M2 des macrophages**

Représentation de la polarisation du macrophage entre les macrophages pro-inflammatoires (M1) et anti-inflammatoires (M2). Les flèches noires indiquent la sécrétion de cytokines par le macrophage. Les récepteurs reconnaissant les ligands sont en vert, les récepteurs de cytokines sont en bleu. Les molécules de stimulation sont en rouge. Les macrophages activés de façon classique (M1) sont induits par le LPS et/ou des produits microbiens. Leur répertoire inflammatoire est caractérisé par la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires et la libération des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS). En revanche, l'activation alternative des macrophages (M2) comprend un continuum d'états fonctionnels classés comme M2a, induits par l'IL-4/IL-13, M2b, induit par des complexes immuns et des agonistes des TLR, et M2c, induits par l'IL-10 et les glucocorticoïdes. Adapté de Benoit et al., 2008 (18).

Les macrophages M2 sont impliqués dans la défense contre les infections parasitaires, dans le remodelage tissulaire et dans la sécrétion d'immunomodulateurs tels que l'IL-10, le TGF-β, l'IL-4, l'IL-13 (19).

Le rôle des macrophages M2 étant diversifié, des nomenclatures ont été proposées pour sous-diviser les macrophages M2 selon leur profil d'activation et les signaux inducteurs ou selon leurs fonctions, cicatrisante ou anti-inflammatoire (18). Ainsi les macrophages M2 peuvent être des macrophages M2a, M2b ou M2c : les M2a sont induits par l'exposition à l'IL-4 ou l'IL-13, les M2b sont induits par les complexes immuns associés aux ligands des TLR et enfin les macrophages M2c sont induits par l'IL-10.

Les macrophages M2a sont ceux qui correspondent le plus à la dénomination de macrophages anti-inflammatoires et les M2c correspondent plutôt aux fonctions réparatrices du macrophage M2 (figure 11).

Cette classification issue d'étude *in vitro* et des stimulations par des inducteurs précis atteint ses limites lorsque l'on étudie des macrophages tissulaires. En effet, il est très difficile de classifier les macrophages hépatiques entre activation classique (M1) ou alternative (M2) car le macrophage semble exprimer simultanément les deux marqueurs. Ainsi, ce concept dichotomique ne peut pas être totalement appliqué *in vivo* (20). L'ensemble de ces recherches indique que la fonction de sous-ensembles de macrophages hépatiques dans le contexte des maladies du foie dépend en grande partie de leur origine. Par conséquent, il est proposé de faire la distinction entre les macrophages résidents hépatiques, les KC, et les macrophages infiltrants dérivés des monocytes circulants, pour caractériser l'hétérogénéité dans le foie.

Les macrophages résidents ou circulants permettent par leur différents récepteurs et médiateurs, d'orchestrer différents aspects du métabolisme et du développement des pathologies métaboliques (21).

### ***II.3.2. Caractéristiques des cellules de Kupffer***

Les KC sont adhérentes aux cellules endothéliales qui composent les vaisseaux sanguins des sinusoides. Le flux sanguin au niveau du foie étant lent, il permet aux KC de patrouiller et de venir aux contacts des antigènes provenant du tractus digestif via la veine porte (bactéries, endotoxines, débris...). En fonction de leur localisation hépatique, les KC ont différentes fonctions et présentent donc des différences morphologiques et physiologiques (22).

On retrouve ainsi deux types de KC directement différenciables par leur taille : des KC larges qui vont être localisées préférentiellement dans la zone périportale et des KC plus petites dans la région centrolobulaire.



Les KC larges vont principalement se spécialiser dans la réponse aux bactéries systémiques (provenant de l'artère hépatique) et aux produits bactériens qui sont transportés de l'intestin vers le foie via la veine porte. Ces KC sont des phagocytes actifs, qui ont la capacité d'absorber des cellules apoptotiques, des cellules bactériennes mortes, des débris cellulaires et d'autres particules transmissibles par le sang (23, 24). En conséquence, ces KC ont une meilleure activité enzymatique lysosomale avec une plus grande capacité phagocytaire que les KC situées dans les autres régions hépatiques. Ces KC sont ainsi responsables de l'élimination de la plupart des particules exogènes et permettent de lancer des attaques biochimiques grâce à la phagocytose. En effectuant cette fonction de phagocytose, la KC augmente sa consommation en oxygène, ce qui entraîne la libération massive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, pour l'anglais *Reactive Oxygen Species*) et de l'azote (RNS, pour l'anglais *Reactive Nitrogen Species*) : c'est le burst oxydatif du macrophage.

Les KC plus petites vont, quant à elles, principalement interagir avec les autres cellules hépatiques via la libération de médiateurs biologiques actifs : des molécules de signalisation telles que les cytokines (le  $\text{TNF-}\alpha$ , le  $\text{TGF-}\beta$ ) et des chimiokines. La libération de chimiokines par les KC entraîne le recrutement de cellules immunitaires comme les cellules NK, NKT, les neutrophiles, ou encore les monocytes. De plus, la KC va surexprimer des molécules d'adhésion, ce qui lui permet de présenter l'antigène aux lymphocytes T cytotoxiques et T régulateurs (Trég). Ainsi la KC participe aussi à l'installation de l'immunité adaptative (5, 6).

Les cytokines, sécrétées par les KC, jouent un rôle clef dans la modulation de la différenciation et de la prolifération des autres cellules. En réponse à une concentration physiologique de LPS, les KC produisent l'IL-10 et le  $\text{TNF-}\alpha$  (25). Ces cytokines entraînent alors une diminution de l'expression du CMH de classe II, une liaison moindre de l'antigène à cette molécule dans les LSEC et les DC ainsi qu'une réduction de l'activation des lymphocytes T (26). Il a été montré que les KC sont impliquées dans les processus de tolérance systémique aux antigènes présentés aux cellules du foie via la veine porte (27). Les KC exercent un effet modérateur sur le développement de la réponse T en inhibant via des prostaglandines l'activation des lymphocytes T par la DC (28).

Ainsi, les KC initient et orchestrent une réponse efficace contre les pathogènes mais sont aussi tolérogènes et peuvent jouer un rôle critique dans la régulation des mécanismes immunitaires hépatiques. De plus, cette notion est étayée par le fait que la déplétion en KC provoque une diminution de la tolérance immunitaire (29).

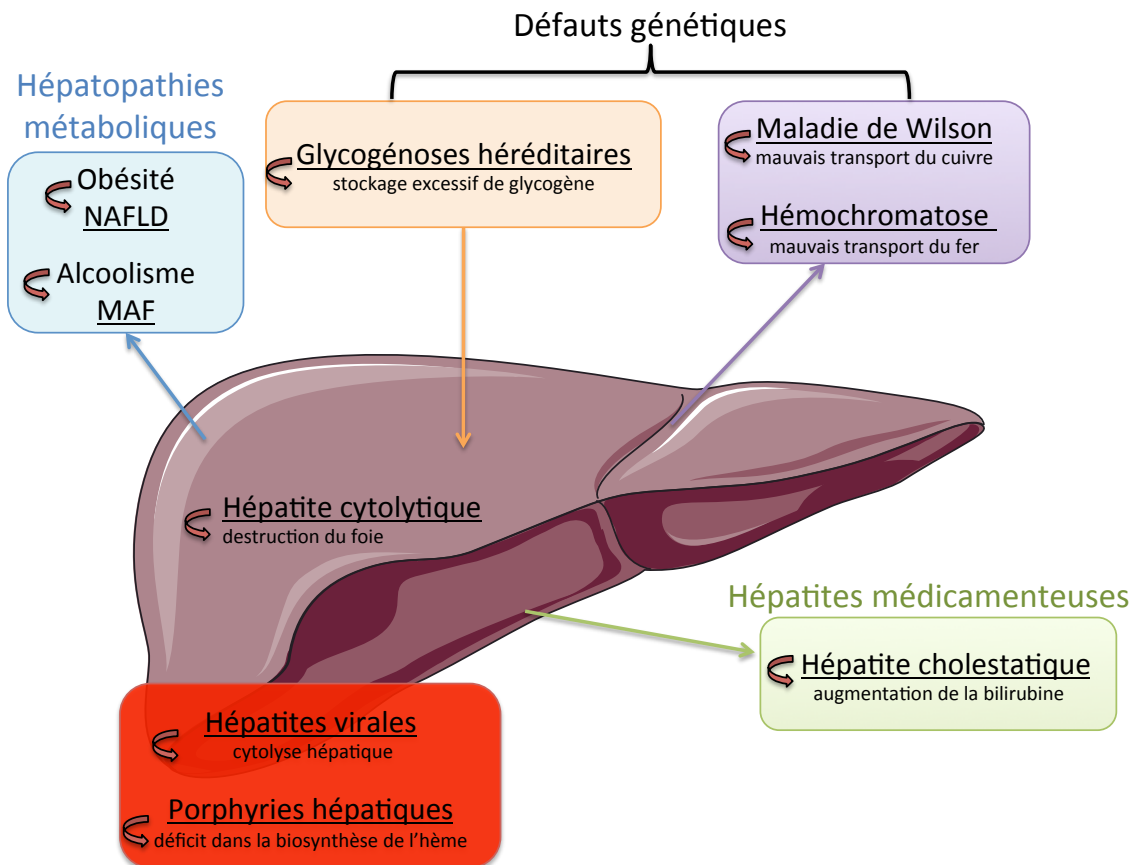
Les KC jouent donc un rôle primordial dans la surveillance immunitaire du foie et leur rôle tolérant est un facteur majeur dans la fonction que le foie exerce pour maintenir une réponse immunitaire locale et efficace. Des dysfonctions au niveau de la KC peuvent donc s'avérer délétères et altérer cette immunité locale. Il est clair actuellement que de telles dysfonctions participent au déclenchement incontrôlé d'une réponse immunitaire et à l'évolution des lésions hépatiques au cours des hépatopathies métaboliques sur lesquelles je reviendrai en présentant mes résultats (30).



## Chapitre III. Les maladies du foie ou hépatopathies

Le foie assure de nombreuses fonctions vitales et la dérégulation de ces fonctions peut avoir un impact sur des voies aussi variées que le métabolisme du glucose et des lipides, la détoxification, ou une altération de la barrière hépatique immunitaire. Les complications hépatiques associées à ces dysfonctions peuvent être plus ou moins importantes et entraîner des maladies du foie : les hépatopathies.

En France, 17,5 % des décès par an sont dus à une hépatopathie (31). Les causes et conséquences de ces hépatopathies sont nombreuses. Outre les hépatopathies métaboliques que nous détaillerons dans les chapitres IV et V, les hépatopathies peuvent être dues à une déficience génétique, un virus, des médicaments ... (figure 12).



**Figure 12 : Schéma des différentes hépatopathies**

La dysfonction hépatique causée par des défauts génétiques, l'ingestion de médicaments, la présence d'un virus, les habitudes alimentaires, conduit à de nombreuses hépatopathies (noms soulignés). Dans les hépatopathies métaboliques, l'obésité peut conduire à la NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease) alors que la forte consommation d'alcool conduira aux MAF (maladies alcooliques du foie).

### III.1. Les hépatopathies dues à une déficience génétique

Les hépatopathies peuvent être héréditaires et causées par une dérégulation d'une protéine de transport qui entraîne un stockage excessif de différentes substances qui deviennent alors toxiques.

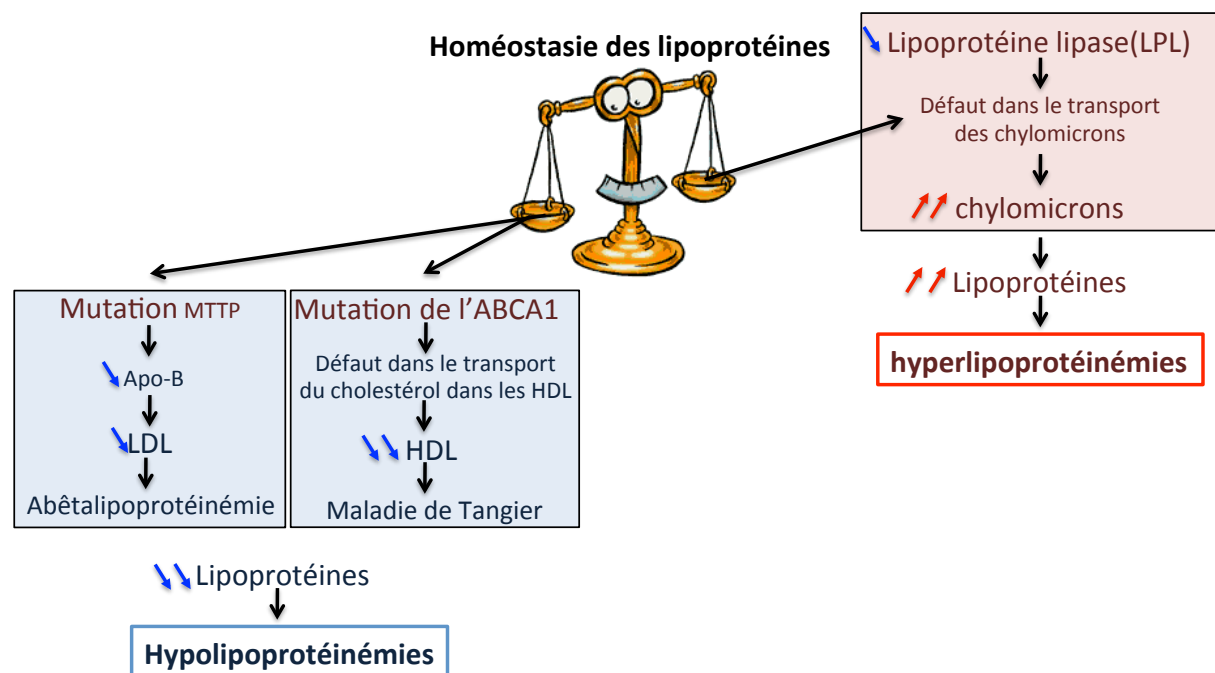
Parmi les hépatopathies liées à une déficience génétique, nous retrouvons la maladie de Wilson, qui est une maladie rare due à une mutation autosomale récessive. Les mutations touchent une protéine du transport du cuivre qui est essentielle pour son élimination dans la bile. Les patients atteints de maladie de Wilson présentent donc une accumulation excessive du cuivre dans le foie et les organes périphériques, principalement dans le cerveau (32). L'hémochromatose est également une maladie génétique mais liée au transport du fer. Elle peut être due à une dérégulation ou à des mutations du gène codant pour la protéine HFE (pour l'anglais *High Fe*), qui est exprimée au niveau de l'entérocyte et est impliquée dans la captation du fer. La maladie est ainsi caractérisée par une hyper-absorption digestive du fer et a pour conséquence un dépôt de fer au niveau de différents organes tels que le foie, le cœur ou la peau.

La dérégulation génétique d'enzymes impliquées dans la synthèse ou la dégradation des lipides entraîne également des hépatopathies plus ou moins importantes. Les lipidoses héréditaires sont causées par des dysfonctions des lysosomes, des organites cellulaires responsables du recyclage des métabolites impliqués dans le métabolisme des lipides. Ces maladies sont donc à classer au sein d'une famille plus large de pathologies appelées maladies lysosomiales. Lorsque les lysosomes n'assurent plus le recyclage des métabolites suite à un défaut enzymatique, les métabolites s'accumulent dans les cellules et affectent différents organes. Parmi ces maladies, on retrouve notamment la maladie de Gaucher qui touche particulièrement le foie (33). Une diminution de la lipase acide lysosomiale (LAL) induit une accumulation massive d'esters de cholestérol et de TG dans l'organisme. L'inactivation totale de la LAL entraîne la maladie de Wolman qui est mortelle. Alors que la cholestérolase hépatique est le résultat d'une perte partielle de la LAL.

Il existe aussi des désordres lipidiques causés par des altérations génétiques au niveau de protéines impliquées dans l'homéostasie des lipoprotéines. Ainsi, on peut observer une diminution des lipoprotéines, appelées des hypolipoprotéïnémies.

Elles sont causées par des mutations dans le gène de la protéine MTTP (pour l'anglais *Microsomal Triglyceride Transfer Protein*) et entraîne une diminution des Apo-B et des LDL (l'abêtalipoprotéinémie). Des altérations de la protéine ABCA1 (pour l'anglais *ATP-Binding Cassette 1*) qui est impliquée dans le transport du cholestérol dans les HDL, entraînent un déficit sévère des HDL (maladie de Tangier) (figure 13).

A l'inverse, on peut aussi observer des hyperlipoprotéinémies. Un déficit de la LPL entraînera un défaut de transport des chylomicrons qui sera caractérisé par une accumulation de chylomicrons dans le plasma (34).



**Figure 13 : Maladies génétiques liées aux lipoprotéines**

Les mutations génétiques dans les gènes impliqués dans le transport des lipides ou dans la constitution des lipoprotéines entraînent des maladies importantes. Ainsi on peut avoir des défauts génétiques qui diminuent la quantité de lipoprotéines (maladie de Tangier ou abêtalipoprotéinémie qui sont des hypolipoprotéinémies, en bleu) ou qui augmentent la quantité de lipoprotéines, notamment par une augmentation de chylomicrons (les hyperlipoprotéinémies, en rouge).

Le foie intervient également dans le métabolisme et la régulation du glycogène. Les glycogénoses héréditaires regroupent l'ensemble des maladies caractérisées par une accumulation anormale du glycogène. Les glycogénose de type I sont les plus fréquentes de ces maladies qui restent rares. Une dérégulation génétique d'une enzyme impliquée dans le relargage du glucose, la Glucose-6-phosphatase (G6P), entraîne outre des hypoglycémies sévères chez le patient, un stockage excessif du glucose sous forme de glycogène dans le foie.

Cette surcharge est également associée à une stéatose. La complication hépatique majeure de la glycogénose est la survenue d'un adénome, dont les taux de malignité restent cependant faibles.

Il ne faut pas omettre que le foie a également un rôle important dans la biosynthèse de l'hème qui est un cofacteur essentiel pour l'hémoglobine. Le déficit d'une des enzymes intervenant dans la biosynthèse de l'hème entraîne une accumulation excessive des porphyrines conduisant à des hépatopathies regroupées sous le nom de porphyries hépatiques.

### **III.2. Les hépatopathies dues à un virus**

De nombreux virus peuvent entraîner des anomalies de la fonction du foie au cours d'infection systémique, que l'on appelle hépatites virales. Ce terme devrait regrouper toutes les infections hépatiques virales mais en réalité il ne regroupe que les hépatites connues depuis les dernières décennies. On distingue deux grands types d'hépatite virale : celle par transmission oro-fécale, comme l'hépatite A ou E et les hépatites par transmission parentérale et sexuelle comme l'hépatite B, C ou D.

Ces virus, une fois inoculés à l'organisme, infectent alors préférentiellement ou non les hépatocytes. Les cellules infectées participent alors au métabolisme viral, en fabriquant continuellement des copies du virus correspondant. La charge en particules virales croissante finit par induire une cytolysse hépatique.

### **III.3. Les hépatopathies médicamenteuses**

Le foie jouant un rôle de filtre est le premier organe touché en cas d'intoxication, que celle-ci soit due à un empoisonnement par des métaux, des pesticides ou encore des médicaments. Une fois dans le sang, ces médicaments passent dans le foie, sont métabolisés et éliminés naturellement. Cependant, certains médicaments peuvent engendrer une hépatotoxicité en particulier lorsqu'il s'agit de traitement chronique long. Il s'agit à ce moment-là d'évaluer la balance bénéfice/risque avant l'arrêt du traitement.

Il existe deux types d'hépatites médicamenteuses aiguës.

Tout d'abord, il y a l'hépatite cholestatique qui est une inflammation du foie accompagnée de l'arrêt de la circulation de la bile, caractérisée par une augmentation de la bilirubine. Ensuite il y a l'hépatite cytolytique qui est associée à une inflammation avec une destruction des hépatocytes, caractérisée par l'élévation massive des transaminases. Cette cytolysé hépatocytaire peut être très sévère et accompagnée d'une défaillance hépatique. Cette forme d'hépatite dite fulminante est une des indications de greffe de foie en urgence. Cependant, les hépatites médicamenteuses les plus courantes sont les hépatites mixtes, c'est à dire les hépatites qui sont à la fois cytolytiques et cholestatiques.

Le paracétamol, par exemple, est un médicament dont la toxicité est prévisible en fonction du dosage. Il est recommandé de ne pas dépasser la dose thérapeutique de 4 grammes par jour, sinon ce médicament peut être responsable d'une hépatite cytolytique généralement associée à une défaillance multi viscérale, pouvant entraîner notamment une hépatite fulminante ou une nécrose massive du parenchyme hépatique. Depuis le début des années 2000, l'hépatite fulminante est plus souvent causée par une intoxication médicamenteuse, 57 %, que par des virus, environ 10 % (35). Il est à noter qu'en France, 22 % des greffes hépatiques suite à une hépatite fulminante sont dues à l'intoxication au paracétamol (36).

Néanmoins il faut savoir que des doses moins importantes sont quelquefois fatales tout particulièrement chez les patients présentant déjà une insuffisance hépatique comme chez les patients alcooliques ou les patients avec des antécédents d'intoxication.

### **III.4. Les hépatopathies métaboliques**

Les hépatopathies peuvent également être métaboliques, c'est-à-dire qu'elles affectent le bon fonctionnement du métabolisme cellulaire. Ces hépatopathies sont d'une part liées au surpoids ou à l'obésité et d'autre part liées à une surconsommation chronique d'alcool.



L'obésité est caractérisée par une accumulation de graisse corporelle accompagnée d'une inflammation chronique à bas bruit. L'excès alimentaire et une baisse de l'activité physique sont les principaux inducteurs du développement de différentes maladies liées à cette surcharge pondérale. L'ensemble des maladies non alcoolique du « foie gras » associé à l'obésité est regroupé sous le terme générique de NAFLD (pour l'anglais *Non Alcoholic Fatty Liver Disease*).

La consommation excessive d'alcool entraîne également des complications hépatiques proches de celles de l'obésité mais dont certains éléments de la pathogenèse diffèrent. Nous parlerons de maladie alcoolique du foie (MAF).

Notre propos va se focaliser sur ces hépatopathies dont les causes sont finalement nutritionnelles puisque dans un cas cela va être lié à une suralimentation (NAFLD), et dans l'autre à la consommation d'alcool (MAF).

## Chapitre IV. Les hépatopathies métaboliques liées à l'obésité ou NAFLD

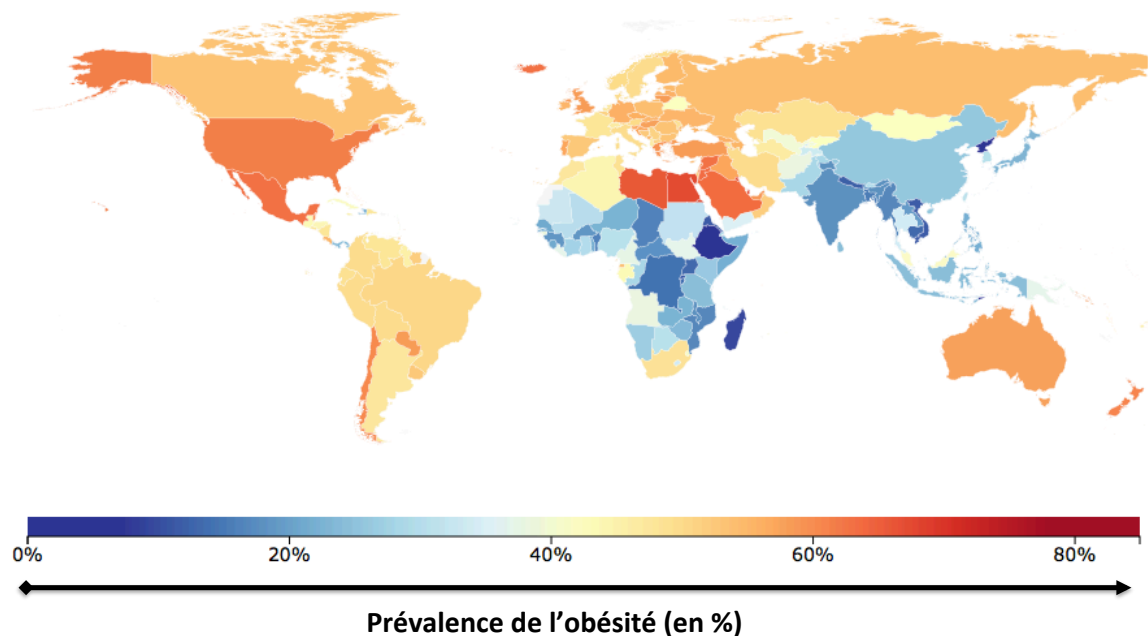
La NAFLD regroupe l'ensemble des lésions du foie qui vont apparaître au cours du surpoids et de l'obésité. La prévalence estimée dans le monde varie de 6,3 % à 33 % dans la population générale avec une prévalence moyenne de 20 % (37). Elle représente donc l'une des principales maladies chroniques du foie à l'échelle mondiale, en particulier parce que le surpoids et l'obésité sont devenus un problème de santé public.

### IV.1. L'obésité

Selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'obésité est caractérisée par une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle représentant un risque pour la santé. L'obésité est, depuis 1997, reconnue par l'OMS comme une maladie chronique. Depuis 2014, l'obésité a même été considérée comme un handicap au travail par la Cour de Justice de l'Union Européenne. Cette pandémie émergente était autrefois considérée comme un problème propre aux pays à haut revenu, mais elle a spectaculairement augmentée dans les pays à faible ou moyen revenu et principalement dans les milieux urbains.

Le surpoids et l'obésité peuvent être calculés en utilisant l'indice de masse corporel (IMC). L'IMC est calculé en divisant la masse d'un individu en kilogrammes par la taille en mètre, élevée au carré. Par exemple, pour un individu mesurant 1,60 m et pesant 70 kg, le calcul sera :  $70 / 1,60^2$  et l'IMC sera de 27,3. Sur cette base, chez un adulte, un IMC est considéré comme normal quand il se situe entre 18 et 25. Un IMC inférieur à 18 est associé à une maigreur excessive. Inversement, un IMC entre 25 et 29,9 définit des personnes en surpoids, et au-delà de 30, la personne est considérée comme obèse. On parle d'obésité sévère avec un IMC compris entre 35 et 39,9 et d'obésité morbide au-delà de 39,9. L'IMC est donc un calcul simple qui a, entre autre, servi de base pour les études épidémiologiques depuis plusieurs années.

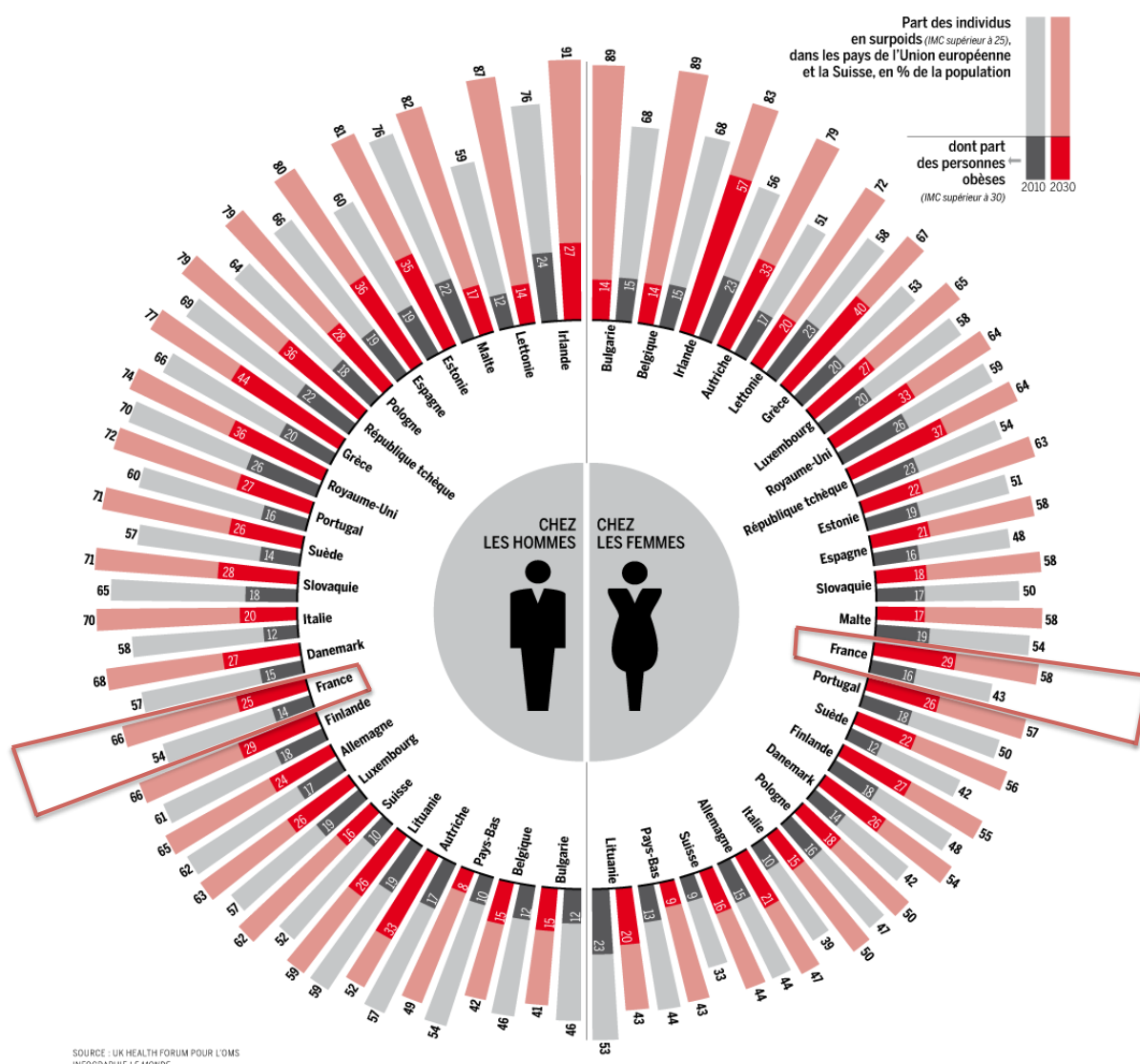
Le nombre de personnes en surpoids ou obèses au niveau mondial augmente de jour en jour : en trente ans, ce nombre est passé de 28 à 36 % chez l'adulte, dont 13 % d'obèses soit 1,9 milliard d'adultes (38) (figure 14).



**Figure 14 : Répartition mondiale de la prévalence de l'obésité en 2013**

*Carte du monde colorée en fonction de la prévalence de l'obésité selon un code couleur progressif. Ainsi, les pays avec de faibles prévalences de l'obésité (inférieures à 40 %) sont dans les couleurs froides (bleu) et les pays avec des taux de prévalence de l'obésité élevée (à partir de 40 %) dans les couleurs de plus en plus chaudes en fonction de l'augmentation de cette prévalence (jaune à rouge). Adapté des études de l'Institute for Health Metrics and Evaluation.*

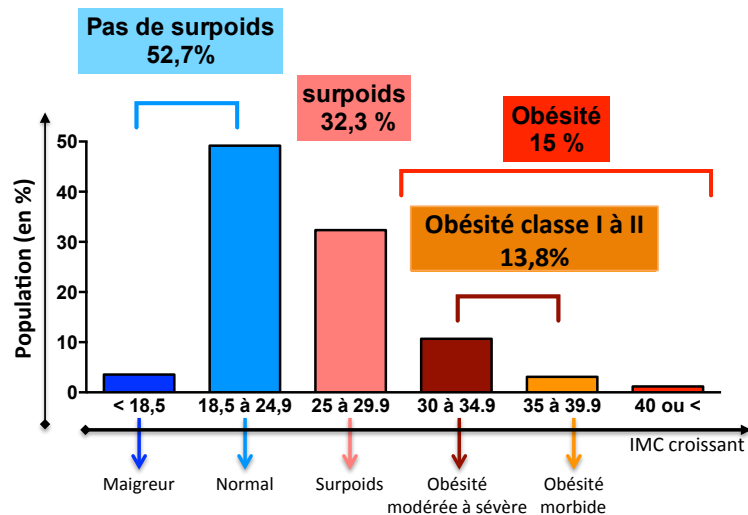
Le surpoids et l'obésité sont ainsi le cinquième facteur de risque de décès au niveau mondial avec au moins 2,8 millions d'adultes qui meurent chaque année des complications associées à l'obésité. D'après une modélisation du journal « le Monde » paru en avril 2015 (39), si les états ne trouvent pas une solution pour contrecarrer cette évolution, il semblerait qu'en 2030, chaque pays connaîtra une augmentation du pourcentage de personnes en surpoids d'environ 6 % dont une augmentation de 12 % de personnes obèses (figure 15).



**Figure 15 : Evolution de l'obésité en 2030 dans différents pays**

Modélisation des pourcentages de personnes en surpoids (rouge clair) ou obèses (en rouge foncé) en 2030, comparé à ceux de 2010 (gris clair pour les surpoids et gris foncé pour les obèses) chez l'homme (gauche) et chez la femme (droite) dans différents pays. La France est encadrée en rouge. Tiré d'un article du Monde (39).

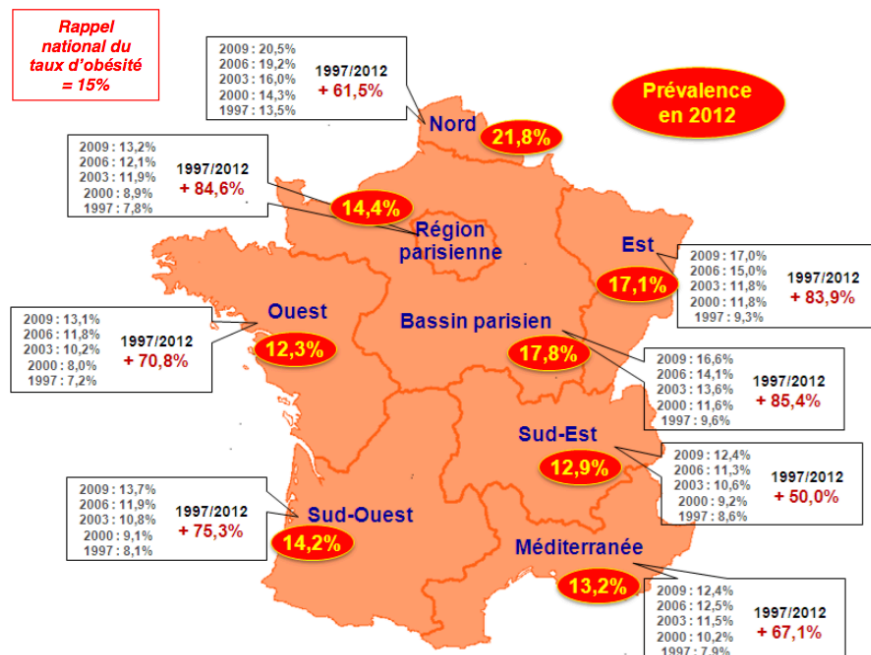
A l'échelle de la France les pronostics sont tout aussi alarmants que dans le reste du monde. D'après la dernière étude épidémiologique effectuée en France en 2012 (40), le surpoids touche 47 % des individus. Parmi ces 47 %, l'IMC classe 15 % de ces individus comme obèses (figure 16).



**Figure 16 : Répartition de la population française selon les IMC**

Répartition de la population française (en %) selon leur IMC. On peut voir que 47,3 % des Français sont en surpoids ou obèses. Adapté des résultats Obépi 2012 (40).

D'après la carte de France décrivant la prévalence de l'obésité en France, nous pouvons voir que l'obésité est fortement dépendante de la région, ce qui supporte l'argument que l'obésité est lié à un mode de vie et malheureusement aussi à des contraintes socio-économiques. Par ailleurs, l'évolution de la prévalence de l'obésité depuis 1997 en France ne fait qu'augmenter, notamment avec une hausse de 84,6 % pour la région parisienne et 85,4 % pour le bassin parisien (figure 17).



**Figure 17 : Evolution de la prévalence de l'obésité en France depuis 1997**

Carte de France avec les régions principales. Dans les ronds rouges, la prévalence de l'obésité en 2012. Les cadres blancs résument la prévalence de l'obésité depuis 1997. Le pourcentage d'augmentation entre 1997-2012 est écrit en rouge. Adapté de l'Obépi 2012 (40).

Les complications qui sont associées au surpoids et à l'obésité sont nombreuses et variées. Elles sont majoritairement dues à des dérégulations du métabolisme des lipides et du glucose. Le risque de développer un diabète de type 2 (DT2) est aussi largement augmenté avec 45 % des personnes ayant un DT2 qui sont en surpoids et 37 % qui sont obèses (41). Les maladies cardiovasculaires sont aussi augmentées chez les patients obèses. La prévalence de l'obésité était de 33 % chez les patients adressés en laboratoire de cathétérisme cardiaque à l'université de Duke (42). Par ailleurs, et de manière plus récente, il a été montré que le surpoids et l'obésité sont des facteurs majeurs dans le développement des complications hépatiques, longtemps associées à la seule consommation d'alcool. De même, des complications mécaniques, des problèmes osseux et de cartilage vont apparaître avec la surcharge pondérale, pouvant engendrer avec une baisse de l'activité physique un cercle vicieux conduisant à l'aggravation de nombreux symptômes.

Actuellement, si l'IMC est un baromètre du surpoids et de l'obésité, les risques potentiels de complications chez les patients sont évalués par la présence d'un syndrome métabolique associée ou non à cette obésité. L'obésité est fortement liée à différents paramètres biologiques perturbés telles que : l'hypertension, l'obésité abdominale, l'élévation des triglycérides, la réduction des HDL, l'élévation de la glycémie à jeun et l'insulino-résistance. Le terme de syndrome métabolique regroupe l'ensemble de ces perturbations vasculaires et glucido-lipidiques (figure 18).

<b>SYNDROME METABOLIQUE</b>	<b>Seuil retenu</b>	
<b>Facteurs de risques</b>	<b>Homme</b>	<b>Femme</b>
<b>Hypertension</b>	≥130 / 85 mm Hg ou traitement antihypertenseur	
<b>Dyslipidémie</b>	≥1,5 g/L	
<b>HDL-Cholestérol</b>	<0,4 g/L	<0,5 g/L
<b>Obésité viscérale</b>	>102	>88
<b>Glycémie à jeun</b>	≥1,1 g/L	

**Figure 18 : Liste des critères d'évaluation du syndrome métabolique**

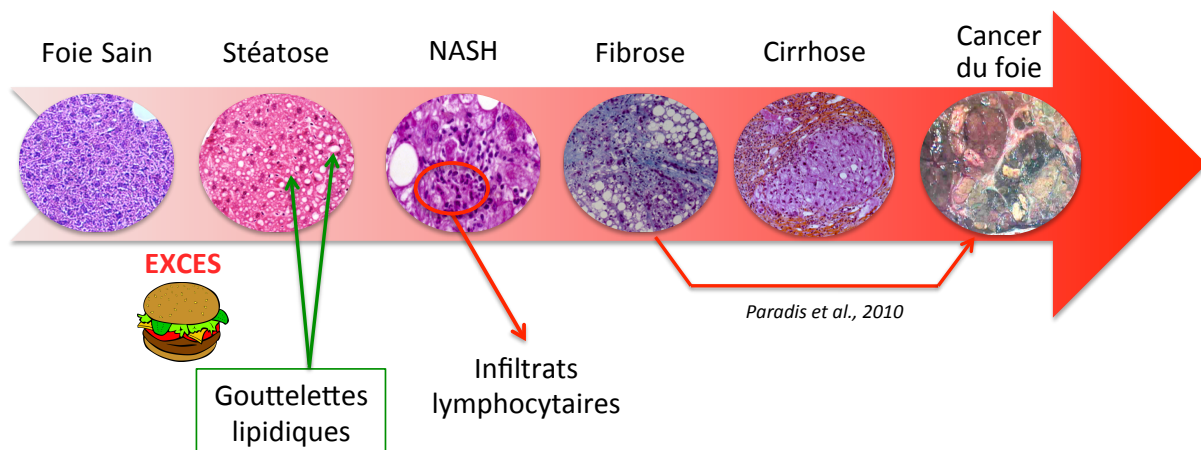
*Le syndrome métabolique est caractérisé par différents facteurs de risque résumés dans le tableau ci-dessus. La présence d'au moins 3 items dont les constantes sont supérieures à la norme pose le diagnostic de syndrome métabolique. Adapté de D. Junquero et al., 2005 (43).*

La présence d'au moins trois de ces items suffit à poser le diagnostic du syndrome métabolique chez un patient. Le syndrome métabolique est asymptomatique, mais prédispose au développement des maladies cardiovasculaires ou hépatiques (43).

Il est clair que toutes les personnes en surpoids ou obèses ne présentent pas de syndrome métabolique voire ne développent que peu de complications associées à leur surcharge pondérale outre des problèmes mécaniques. Ce constat rend la recherche de cofacteurs associés à la gravité et inversement à la protection des pathologies associées à l'obésité essentielle.

## IV.2. La NAFLD

La NAFLD regroupe l'ensemble des lésions hépatiques qui vont du stade de la stéatose à la stéatohépatite non alcoolique NASH (pour l'anglais *Non Alcoholic Steatohepatitis*), la fibrose, la cirrhose et l'hépatocarcinome (figure 19).



**Figure 19 : Les différents stades de la NAFLD**

*Progression des stades des hépatopathies liées à la NAFLD. L'excès alimentaire entraîne l'apparition de gouttelettes lipidiques au sein des hépatocytes, c'est la stéatose. La stéatohépatite (NASH) est associée à une inflammation et on peut observer l'évolution vers la fibrose, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire (CHC). Des études ont montré que des patients ayant une fibrose peuvent évoluer directement vers un CHC sans cirrhose.*

Le diagnostic de NAFLD est compliqué à poser car il exige l'exclusion de toute autre cause de maladie hépatique, comme par exemple, une forte consommation d'alcool, une maladie héréditaire, ou une infection virale (44). De plus, la difficulté du diagnostic réside dans le fait que ce sont des maladies asymptomatiques y compris à des stades avancés de fibrose voire de cirrhose et qu'elles sont souvent découvertes tardivement.

Les différents stades de la NAFLD peuvent être définis selon des observations anatomo-pathologiques des biopsies hépatiques. La classification des stades de la NAFLD comprend une description et une semi quantification de la stéatose et des lésions cellulaires, une évaluation de l'inflammation et du stade de fibrose. Cependant, la frontière entre les différents stades de la NAFLD est imprécise. Différents scores participent à l'évaluation des différents stades de la NAFLD.

Le score NAS (pour l'anglais *NAFLD Activity Score*) est quantitatif et combine l'observation de trois caractéristiques des lésions hépatocellulaires et nécro-inflammatoires : la quantification de la stéatose, l'inflammation lobulaire montante et les lésions hépatocytaires caractérisées d'un point de vue morphologique par des hépatocytes « ballonnés » (ballooning). Chaque caractéristique est quantifiée en associant la sévérité à un numéro croissant et la somme non pondérée des trois caractéristiques représentent ce score (figure 20). Dans la NAFLD, la stéatose peut être graduée en trois stades en fonction du pourcentage d'hépatocytes ayant des vacuoles macrovésiculaires : le stade de stéatose moyen (S1) entre 5 et 33 %, modéré (S2) avec 34 à 66 % et sévère (S3) avec plus de 66 % des hépatocytes touchés (figure 20) (45).

	Critères histologiques du score NAS		
Grade	Stéatose <i>(% d'hépatocytes contenant des gouttelettes lipidiques)</i>	Inflammation lobulaire <i>(nombre de foyer inflammatoires par champs de grossissement X200)</i>	Ballonisation hépatocytaire <i>(nombre de cellules ballonnées)</i>
0	< 5%	0	0
1	5 à 33%	< 2	quelques cellules ballonnées
2	34 à 66%	2 à 4	nombreuses cellules ballonnées
3	> 66%	> 4	
	Score NAS (de 0-8 )		
	0 < Score NAS < 2 : absence de NASH		
	3 < Score NAS < 4 : borderline		
	Score NAS > 5 : présence de NASH		

**Figure 20 : Critères histologiques du score de NAS**

Le score NAS (*NAFLD Activity Score*) permet d'évaluer le stade de la NAFLD selon trois critères : la stéatose, l'inflammation lobulaire et la ballonisation des hépatocytes. La stéatose est gradée en pourcentage d'hépatocytes ayant des gouttelettes lipidiques et les deux autres critères (inflammation et ballonisation) en nombre de foyers inflammatoires et d'hépatocytes ballonnés. La somme des 3 critères donne le score NAS : entre 0 et 2, il n'y a pas de stéatohépatite (NASH), entre 3 et 4, c'est entre les deux (borderline) et au-delà d'un score NAS de 5, c'est la présence d'une NASH. Adapté de Kleiner et al., 2012 (45).



Le Score Metavir est utilisé pour quantifier l'atteinte tissulaire plus spécifiquement lorsque il existe une fibrose (46). Ce score s'appuie d'une part sur les lésions inflammatoires associées ou non à une nécrose et d'autre part sur l'évaluation de la fibrose (figure 21).

Score Metavir		
Intensité	Activité	Fibrose
Absente	A0	F0
Minime	A1	F1
Modérée	A2	F2
Sévère	A3	F3
Cirrhose		F4

**Figure 21 : Score Metavir**

*Le score Metavir permet l'évaluation de la fibrose. Il est basé sur l'activité (A) et l'évolution de la fibrose (F) de l'hépatite quantifiées indépendamment. Adapté du site ccr.fr.*

L'évaluation ponctuelle et partielle de la sévérité de la cirrhose peut aussi être réalisée à l'aide du score de Child Pugh (47). La gravité est croissante avec la valeur du score (figure 22). Ce score ne prend pas en compte certaines complications de la cirrhose telles que l'hémorragie digestive ou le carcinome hépatocellulaire. Cette évaluation n'est valable que pour la cirrhose non compliquée, soit hors période aigüe type décompensation oedemato-ascitique, ictère, encéphalopathie, hémorragie digestive ou CHC.

Score Child Pugh			
Calcul des points	1	2	3
Bilirubine (μmol/L)	< 35	35 - 50	> 50
Albumine (g/L)	> 35	28 - 35	< 28
Ascite	Absente	Minime	Modérée
Taux de prothrombine (%)	> 50%	40 - 50%	< 40%
Encéphalopathie	absente	contrôlée médicalement	mal contrôlée médicalement

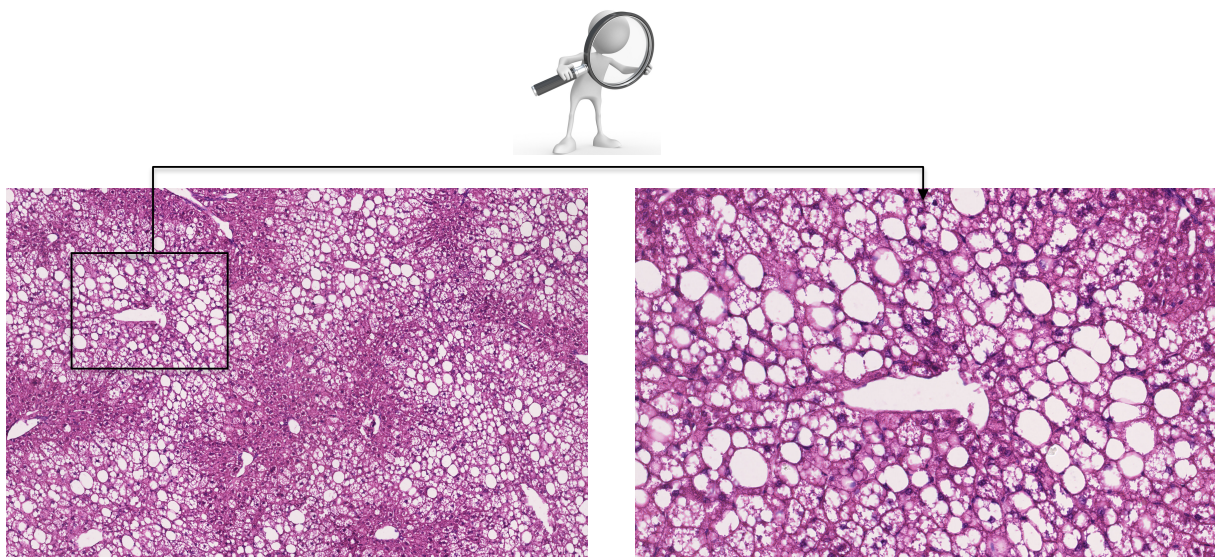
**Figure 22 : Score Child Pugh**

*Représentation des paramètres définissant le score de Child Pugh. Les patients sont classés en 3 classes selon leur nombre de points. Classe A : 5 à 6 ; Classe B : 7 à 9 ; Classe C : 10 à 15. Pour la classe A : la survie à 1 an est de 100 %, la survie à 5 ans est de 85 %. Pour la classe B : la survie à 1 an est de 81 %, la survie à 5 ans est de 57 %. Pour la classe C : la survie à 1 an est de 45 %, la survie à 5 ans est de 35 % (47, 48).*

### IV.3. Les différents stades de la NAFLD

#### IV.3.1. La stéatose

La stéatose se caractérise par l'accumulation de gouttelettes lipidiques au sein du cytoplasme des hépatocytes et est considérée comme un stade bénin et réversible de la pathologie. Dans la majorité des cas de NAFLD, cette stéatose est macrovésiculaire et peut être répartie de manière homogène ou pas au sein du parenchyme hépatique. En effet, on peut retrouver une zonation de la stéatose autour des espaces portes ou bien plutôt localisée au niveau des veines centro-lobulaires (figure 23).



**Figure 23 : Homogénéité de la stéatose au sein du parenchyme hépatique**

*Chez le rongeur, la stéatose observée suite à un régime hypercalorique est principalement centrolobulaire. Grossissement x 3,9 à gauche et x 10,4 à droite. Adapté de Ferrere et al., soumis.*

La stéatose est retrouvée chez 60 à 74 % des patients obèses et chez plus de 90 % des patients présentant une obésité morbide (49). Ainsi, certains patients obèses ne présentent pas de stéatose. Il existe donc une hétérogénéité à développer des complications hépatiques chez les patients obèses et ce dès les premiers stades de la NAFLD.

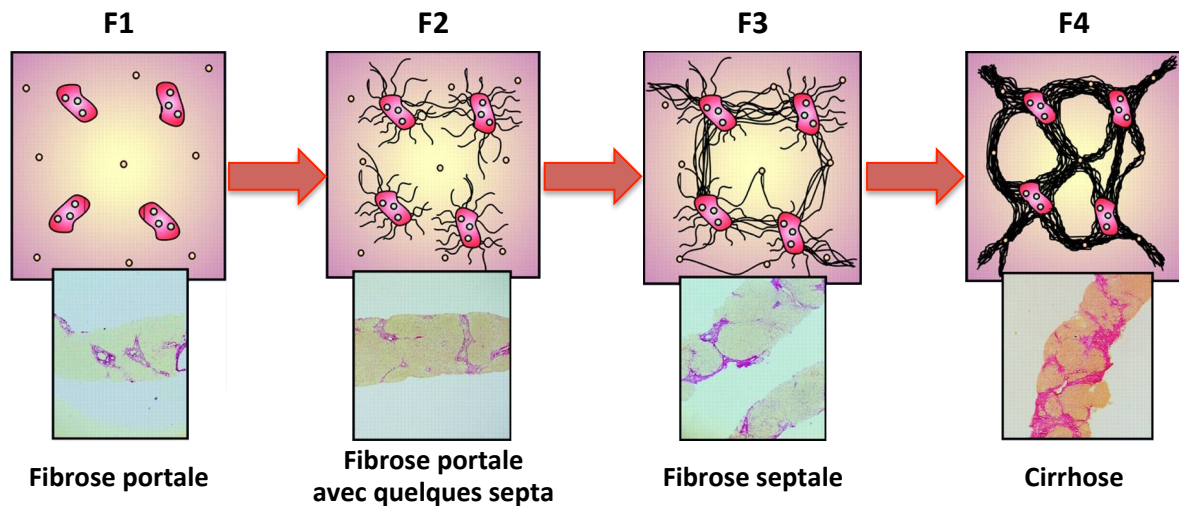
#### **IV.3.2. La stéatohépatite ou NASH**

L'inflammation qui survient sur un foie stéatosique est définie comme une NASH. Cette inflammation se caractérise par la présence d'infiltrats inflammatoires composés de lymphocytes et de nombreux neutrophiles. Il est à noter que chez les rongeurs, l'infiltration par les neutrophiles reste faible lors de l'inflammation hépatique associée à l'obésité et en particulier celle induite par un régime enrichi en graisses (HFD, pour l'anglais *High Fat Diet*).

Parmi les patients ayant une stéatose, seuls 20 % d'entre eux développeront une NASH (50). Là encore, nous ne pouvons que constater qu'il existe une forte hétérogénéité entre les patients et que d'autres facteurs que la surcharge pondérale et la stéatose vont intervenir dans l'évolution de la NAFLD. L'inflammation chronique lors de la NASH va engendrer des lésions et la formation de tissus cicatriciels non fonctionnels caractéristiques de la fibrose.

#### **IV.3.3. La fibrose**

Le tissu fibreux, composé essentiellement de collagène de type I et III, entoure les hépatocytes, les isole et ainsi les empêche d'exercer leurs fonctions au sein du foie (51). Selon le stade de la fibrose, les dommages subis par le foie peuvent être plus ou moins importants. Il existe quatre stades de fibrose : le foie normal a un stade de fibrose de 0 (F0) ; la fibrose légère est comprise entre un stade F1 et F2 ; la fibrose sévère en F3 ; le stade le plus avancé est la cirrhose (F4). Dans les stades avancés, la fibrose entoure les lobules hépatiques formant des nodules de régénération qui vont rendre le foie non fonctionnel. Au stade de cirrhose, le foie perd ses différentes fonctions qui vont être associées à des complications de plus en plus graves jusqu'à la défaillance hépatique (figure 24).



**Figure 24 : Les différents stades de fibrose**

La fibrose est un processus de cicatrisation qui va remplacer les cellules hépatiques endommagées. Il existe 4 stades de fibrose : le foie normal a un stade F0. Le stade F1 et F2 désignent une fibrose légère et le stade F3, une fibrose sévère. On parle de cirrhose à partir du stade F4, lorsqu'il existe dans tout le foie du tissu cicatriciel. Image adapté de Mannan et al., 2015 (52).

#### IV.3.4. L'hépatocarcinome ou carcinome hépatocellulaire

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la forme histologique la plus fréquente de cancers primitifs. Très rarement, le CHC survient sur un foie sain (53). Dans plus de 90 % des cas, il survient sur un foie qui est déjà endommagé par une maladie chronique du foie, généralement une cirrhose. Ainsi, la cirrhose est le plus grand facteur de risque pour le CHC (54).

Les CHC sont la 5<sup>ème</sup> cause de cancer dans le monde et la 3<sup>ème</sup> cause de mortalité par cancer. Le pronostic du CHC reste à l'heure actuelle mauvais avec seulement une survie moyenne évaluée de 5 ans.

Le score de MELD (pour l'anglais *Model for End-Stage Liver Disease*) est un score pronostic qui s'applique aux patients en liste d'attente de transplantation. Il utilise les valeurs de la bilirubine totale, de la créatinine sérique et le taux de prothrombine pour prédire la survie. Il existe une relation étroite entre le score de MELD et le risque de mortalité dans les trois mois des patients en liste d'attente de greffe de foie (figure 25) (55).

Score MELD	<10	10-19	20-29	30-39	40
mortalité dans les 3 mois (en %)	4	27	76	83	100

**Figure 25 : Corrélation entre le score MELD et la mortalité**

*Le score MELD (Model for End-Stage Liver Disease) est un système de notation pour évaluer la gravité d'une maladie chronique du foie. Ce score est étroitement lié au risque de mortalité dans les trois mois. Adapté de Kamath et al., 2001 (55).*

Au stade de CHC, il y a peu de possibilités de traitement possible. Pour les CHC localisés, une exérèse est possible si les parties du foie atteintes sont restreintes. Il y a aussi la chimio-embolisation transartérielle qui consiste en l'association d'une molécule de chimiothérapie qui va attaquer les cellules cancéreuses et d'un produit qui va boucher l'artère qui alimente la tumeur en oxygène et en nutriments. Dans d'autre cas, la transplantation hépatique reste le seul traitement curatif possible. En 2013, seulement 1241 patients ont reçues une transplantation hépatique sur 2924 personnes sur liste d'attente, soit 42 %. Outre cette pénurie de greffon il existe de nombreuses contre-indications pour la transplantation hépatique (hypertension portale, ascites ...) (56).

Cependant, l'augmentation des cas de NAFLD due à l'augmentation des cas d'obésité tend malheureusement à favoriser l'apparition d'un CHC et ce processus peut être accéléré. En effet, il a été montré qu'un CHC pouvait se développer sur un foie au stade F3 de fibrose chez des patients obèses, diminuant ainsi le temps d'apparition du CHC (57) La cirrhose ne semble donc pas être un pré requis au développement d'un CHC dans la NAFLD.

La compréhension des mécanismes précoces de la NAFLD reste donc à ce jour un enjeu crucial pour limiter l'évolution de la NAFLD vers les formes graves de la pathologie.

#### IV.4. Les dérégulations métaboliques associées à la NAFLD

Les perturbations métaboliques surviennent au cours de la NAFLD et vont contribuer d'une part au développement de la stéatose et d'autre part à l'apparition de l'inflammation.

Si la théorie des deux hits décrite dès 1998 par Christopher Day a longtemps défini la stéatose et l'inflammation comme deux événements successifs, les données actuelles tendent à prouver que ces événements sont intimement intriqués (58).

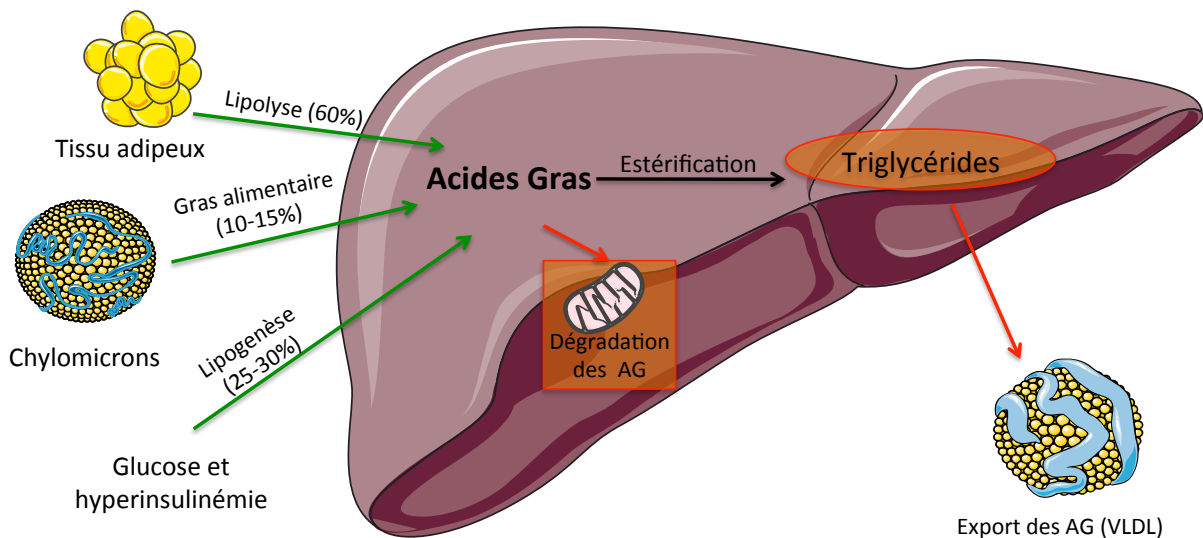
Les dérégulations métaboliques dans la NAFLD sont associées au développement de la stéatose. Les causes de cette stéatose sont multiples et vont être dues à une profonde dérégulation de l'homéostasie des lipides.

- un apport alimentaire excessif en lipides
- une augmentation de la captation des AG
- une augmentation de la lipogenèse *de novo*
- une augmentation du stockage des TG
- une diminution de la dégradation des AG via la  $\beta$ -oxydation
- une dérégulation de l'excrétion des VLDL

##### IV.4.1. Les acide gras acteurs de la stéatose

###### ***Augmentation de la captation des AG par le foie***

L'une des principales causes de la stéatose est le déséquilibre entre la disponibilité des lipides et leur dégradation. Les acides gras proviennent de différentes sources. Les AG utilisés pour la synthèse de triglycérides proviennent des AG non estérifiés issus de la lipolyse provenant du tissu adipeux mais également des AG synthétisés dans le foie via la lipogenèse *de novo*. Chez un patient obèse ayant une stéatose, 15 % des AG qui vont être stockés par le foie sont dus à une augmentation de l'apport alimentaire lipidique (59) (figure 26).



**Figure 26 : Provenance et utilisation des acides gras**

Les acides gras provenant au foie proviennent de différentes sources : du tissu adipeux par la lipolyse, des chylomicrons provenant de l'intestin, de la lipogenèse. Le pourcentage entre parenthèse donne le taux d'apport des acides gras (AG). Adapté de Ferre et al., 2010 (59).

Les adipocytes permettent de stocker l'énergie sous la forme de triglycérides. Bien que la plupart des cellules non adipocytaires contiennent des traces de TG pour assurer leurs fonctions homéostatiques, elles sont protégées contre l'accumulation massive de TG dans des conditions de consommation d'énergie en excès. De toutes les cellules non adipocytaires, l'hépatocyte de mammifère est capable de stocker des quantités considérables d'AG, notamment pour recevoir les AG non estérifiés présents en excès dans le plasma qui sont requis pour la sécrétion immédiate de lipoprotéines de très basse densité (60). La capacité du foie à stocker des lipides est considérée comme un mécanisme de protection pour neutraliser la toxicité potentielle des AG. Ces AG sont libérés dans le plasma à partir du TA ou bien synthétisés *de novo*.

### ***La lipogenèse de novo***

Chez les mammifères, la lipogenèse *de novo* est une voie métabolique qui permet au foie et au TA de transformer l'excès de glucose ingéré en AG. L'association de plusieurs molécules d'acétyl-CoA va leur permettre d'être métabolisées en malonyl-CoA par l'ACC (pour l'anglais *Acétyl-CoA Carboxylase*), précurseur essentiel des chaînes d'AG. Le complexe multi-enzymatique FAS (pour l'anglais *Fatty Acid Synthase*) permet l'élongation des chaînes d'AG allant jusqu'à 16 carbones. Au-delà des 16 carbones, l'élongation des AG saturés se fait via des élongases.

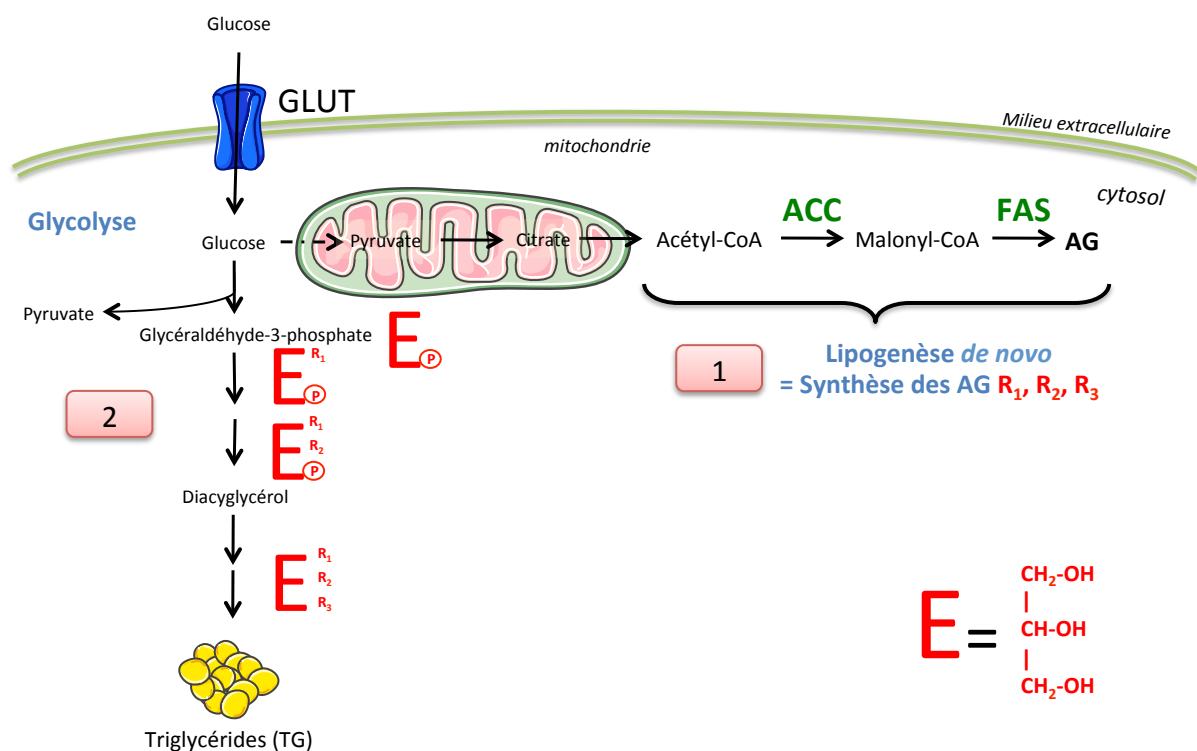


Les AG *per se* présentent une lipotoxicité et favorisent la formation des ROS, ils sont donc au niveau cellulaire stockés sous forme de TG neutres.

Les AG sont ainsi estérifiés à partir du glycéraldéhyde-3-phosphate provenant de la glycolyse et stockés sous forme de TG. Ces TG peuvent être inclus dans les gouttelettes lipidiques entourées de périlipines et pourront ultérieurement fournir de l'énergie grâce à leur dégradation via la  $\beta$ -oxydation mitochondriale (figure 27).

Le TA est un tissu contenant de nombreuses cellules graisseuses appelées adipocytes. Dans un adipocyte, les AG sont aussi synthétisés par la lipogenèse *de novo*, stockés sous forme de TG comme réserve et peuvent être dégradés via la lipolyse selon les besoins énergétiques. Cette lipolyse, qui consiste en l'hydrolyse des TG en AG libres (AGL) et glycérol, représente la source majeure d'AG retrouvés au niveau du foie. Le contrôle de l'hydrolyse des TG se situe essentiellement au niveau d'une enzyme intervenant dans la lipolyse, la Lipase Hormono-Sensible (LHS) qui peut être inhibée par l'insuline. Dans un contexte d'insulino-résistance, les adipocytes ne sont plus capables de répondre correctement aux effets de l'insuline. La levée de l'inhibition de la LHS entraîne une augmentation excessive de la lipolyse adipocytaire. Par conséquent, un afflux important d'AGL parvient dans la circulation et va arriver au niveau hépatique via la veine porte (61). Dans ce contexte, le taux des AGL plasmatiques est augmenté chez les patients obèses mais partiellement tamponné par un stockage des AG dans le foie (50). Chez les patients avec stéatose, 60 % des AGL issus de la lipolyse sont retrouvés dans les TG hépatiques (59). Cette augmentation des AGL dans le foie est corrélée à l'augmentation du TA viscéral, de la graisse intra-hépatique, et à la sévérité de la NAFLD.





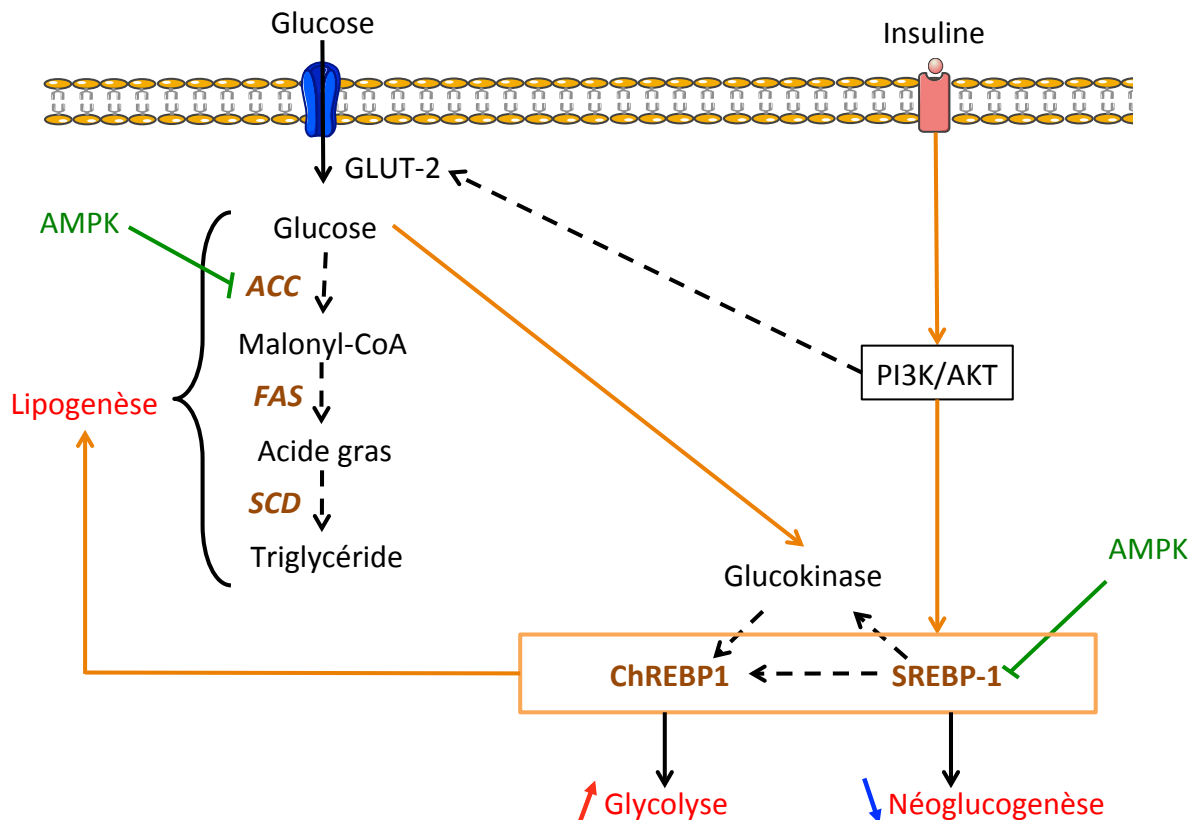
**Figure 27 : Lipogenèse *de novo* et formation des triglycérides**

Le glucose entre dans le milieu intracellulaire via les transporteurs au glucose (GLUT). (1) Ce glucose peut être métabolisé via la lipogenèse de novo par l'action des enzymes ACC (Acetyl-CoA Carboxylase) et FAS (Fatty Acid Synthase) en acides gras (AG). (2) Le stockage des AG se fait ensuite sous forme de triglycérides (TG).

Des études montrent que les lipides séquestrés dans les gouttelettes lipidiques sous forme de TG peuvent protéger les hépatocytes des effets lipotoxiques (62). Cependant, en cas de défaut de synthèse des TG, l'oléate aussi bien que le palmitate peuvent devenir délétères pour les cellules (63). Ainsi la nature des acides gras orientés vers le foie semble liée au développement de la NAFLD.

Les voies de la glycolyse et de la lipogenèse sont contrôlées par les conditions nutritionnelles.

En phase post-prandiale, l'insuline facilite l'incorporation des acides gras provenant des chylomicrons et des VLDL au niveau des différents tissus en augmentant la synthèse de la LPL (64). Elle permet l'entrée dans la cellule du glucose qui est dirigé vers la voie de la glycolyse puis de la lipogenèse en activant dans le foie, la translocation à la membrane des transporteurs de glucose GLUT-2 via la voie de la PI3K (pour l'anglais *Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase*)/AKT (Protéine Kinase B) (65) (figure 28).



**Figure 28 : Les principales voies de régulation de la lipogenèse hépatique**

La signalisation médiée par l'insuline permet d'activer les facteurs de transcription ChREBP-1 (*CarboHydrate Responsive Element Binding Proteins-1*) et SREBP-1 (*Sterol Regulatory Element Binding Protein-1*) par la voie de la PI3K/AKT. Ces facteurs de transcription induisent la lipogenèse, la glycolyse et inhibe la néoglucogenèse. L'AMPK (*Adenosine Monophosphate Protein Kinase*) peut inhiber cette signalisation.

L'inhibition de la néoglucogenèse accompagnée de la stimulation de la lipogenèse, toutes deux par l'insuline, nécessitent la voie de la PI3K/AKT. L'insuline active l'expression de SREBP-1 (pour l'anglais *Sterol Regulatory Element Binding Protein-1*) par la voie de la PI3K/AKT, qui est nécessaire pour la néoglucogenèse et en stimulant la glucokinase, SREBP-1 participe à l'induction de ChREBP-1 (pour l'anglais *CarboHydrate Responsive Element Binding Proteins-1*) qui permet la glycolyse et augmente la disponibilité de précurseurs de la lipogenèse.

SREBP-1 et ChREBP-1 activées permettent l'expression des gènes qui contrôlent la synthèse des TG et des AG tels que l'ACC ou la FAS (65, 66). Dans des modèles de souris ayant une NAFLD, la surexpression hépatique de SREBP-1 entraîne une stéatose hépatique massive consécutive à l'activation des gènes de la lipogenèse et inversement, sa régulation négative permet de diminuer de moitié le taux de triglycérides intra-hépatiques et d'améliorer la stéatose (67).

L'invalidation de ChREBP diminue l'expression des gènes de la glycolyse tels que la L-PK (pour l'anglais *L-Pyruvate Kinase*) et de la lipogenèse (ACC et FAS) (68). Chez l'Homme, les expressions de SREBP-1 et ChREBP-1 sont augmentées dans le foie de patients atteints de NAFLD (69), participant ainsi à l'aggravation de la pathologie.

L'AMPK (pour l'anglais *Adenosine Monophosphate Protein Kinase*) peut en inhibant SREBP-1, réguler négativement la lipogenèse et diminuer la consommation de glucose. Ainsi l'AMPK antagonise les effets délétères de l'insulino-resistance. Dans ce contexte, les modèles de souris obèses montrent que l'activation de l'AMPK est réduite. Cette inhibition de l'AMPK participe également à l'installation de la stéatose. Par ailleurs, l'activation de l'AMPK par des activateurs tels que la metformine permet d'améliorer les dysfonctionnements métaboliques liés à l'obésité dans des modèles de rongeurs obèses (66, 70). Cependant, il est à noter que les effets de la metformine ne passent pas par l'activation de l'AMPK au niveau hépatique (71)

### ***Dégradation des AG via la $\beta$ -oxydation.***

Le corps humain a besoin d'un apport différent en énergie selon les conditions. Une augmentation d'effort (exercice physique) ou un manque d'énergie (période de jeûne) entraîne une demande en énergie de la part de l'organisme. Pour répondre à cette demande, les réserves de TG sont dégradées.

La dégradation des TG entraîne la formation de trois molécules d'acides gras accompagnée d'une molécule de glycérol et peut se faire dans trois organelles différents : la  $\beta$ -oxydation se fait dans les mitochondries pour les AG inférieurs à 20 carbones. Pour les AG de longueurs de chaînes supérieures, leur dégradation s'effectuent au niveau du réticulum endoplasmique (RE) par le cytochrome P450 CYP4A et sont délivrés aux péroxysomes (72).

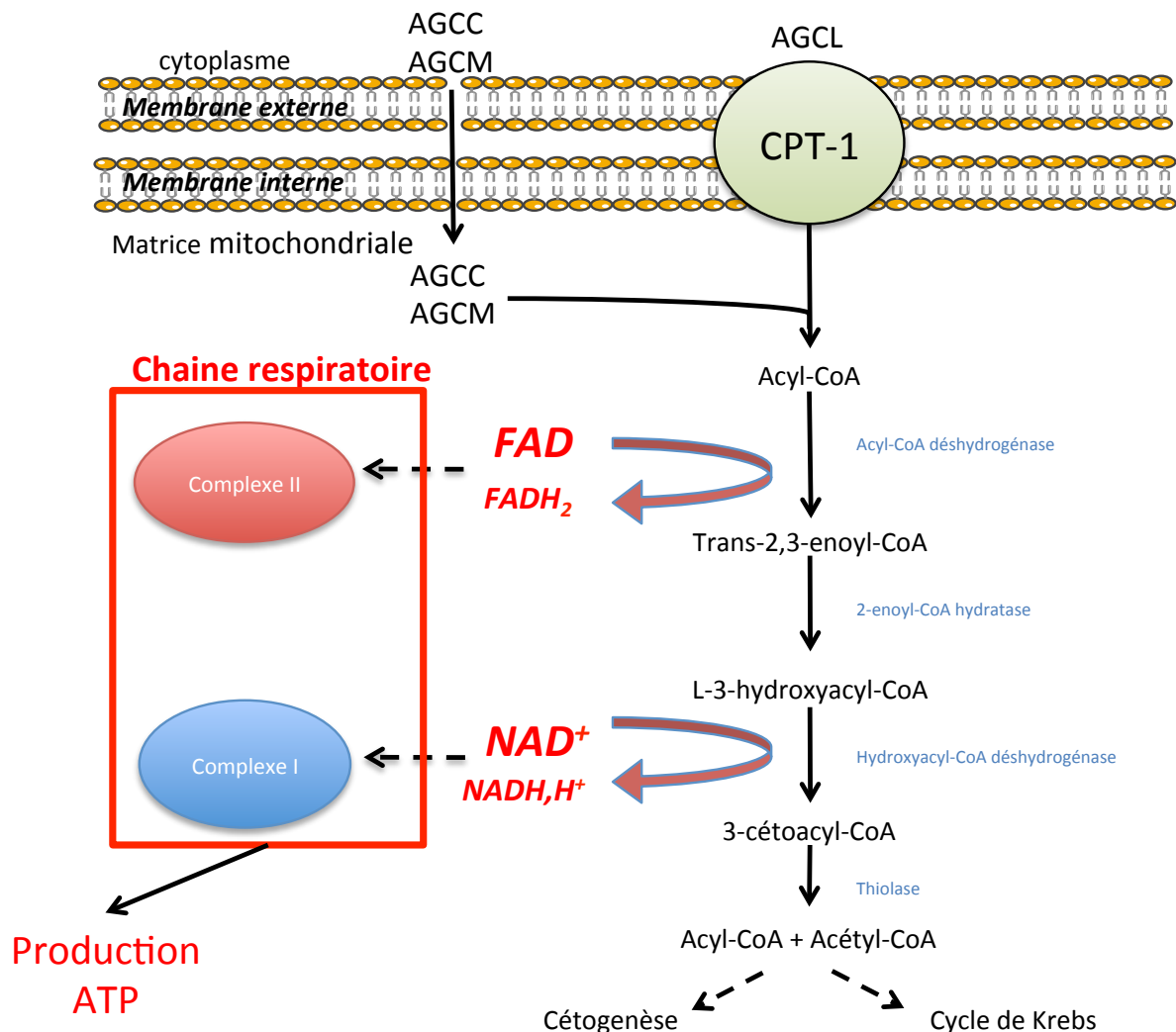
Dans des conditions normales d'alimentation, la majorité des AG constituant les graisses alimentaires sont des AGCL (AG à *Chaînes Longues*) (entre 14 et 24 carbones) (73). Ainsi, la  $\beta$ -oxydation mitochondriale est responsable de la dégradation de la majorité des AG.

Par ailleurs, dans la NAFLD, la voie de dégradation des AG la plus touchée et étudiée est la voie de dégradation via la  $\beta$ -oxydation mitochondriale. En effet, plusieurs études suggèrent que la fonction mitochondriale est altérée chez les patients ayant une NAFLD (74). Lors de la stéatose, l'afflux excessif d'AG dans le foie engendre une saturation de la capacité

d'oxydation qui s'auto-entretient par un dysfonctionnement mitochondrial.

Des altérations structurelles de la mitochondrie, telles que la présence de mégamitochondries ou d'inclusions paracristallines, ont d'ailleurs pu être observées chez des patients ayant une NASH (75).

L'entrée des AG dans la mitochondrie, lieu de la  $\beta$ -oxydation majoritaire, se fait par diffusion pour les AGCC (AG à *Chaînes Courtes*) et AGCM (AG à *Chaînes Moyennes*). Pour les AGL, cette entrée est dépendante de l'enzyme CPT-1 (pour l'anglais *Carnitine Palmitoyl Transferase-1*). La  $\beta$ -oxydation mitochondriale permet l'oxydation complète des AG en acétyl-CoA. Les unités de l'acétyl-CoA ainsi produites, peuvent soit entrer dans le cycle de Krebs, soit se condenser pour former des corps cétoniques dans le foie (acétoacétate, acétone, et  $\beta$ -hydroxybutyrate) pour servir de combustibles oxydables pour les tissus extra-hépatiques (76) (figure 29).



**Figure 29 : Dégradation des acides gras par la  $\beta$ -oxydation mitochondriale**

La dégradation complète des acides gras par la  $\beta$ -oxydation mitochondriale conduit à la conversion de cofacteurs oxydés ( $\text{NAD}^+$  et  $\text{FAD}$ ) en cofacteurs réduits ( $\text{NADH}$  et  $\text{FADH}_2$ ). La chaîne respiratoire mitochondriale, source principale d'ATP, permet à ces cofacteurs réduits d'être continuellement réoxydés par transfert de leurs électrons au premier complexe de la chaîne. Les électrons sont ensuite transmis successivement à travers les différents complexes de la chaîne respiratoire, logés dans la membrane interne de la mitochondrie. Ce flux d'électrons est associé à une extrusion de protons hors de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire, créant un potentiel électrochimique suffisant pour que l'ATP-synthase catalyse la formation d'ATP. Les électrons migrent le long de la chaîne respiratoire et, au final, réagissent avec l'oxygène pour former de l'eau. Cependant, quelques électrons peuvent réagir directement avec l'oxygène pour former des espèces réactives de l'oxygène.

Des souris invalidées pour PPAR- $\alpha$  montrent une diminution de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale et développent une stéatose macrovésiculaire localisée au niveau centrolobulaire (77). Si, à cette perte de fonction, est associée une délétion des allèles du gène codant pour l'enzyme clef de la  $\beta$ -oxydation péroxydomale, la fatty acyl-CoA oxidase (AOX), une stéatohépatite microvésiculaire est observée. Ainsi, PPAR- $\alpha$  et AOX ont un rôle important dans le métabolisme des lipides au niveau hépatique et dans la NAFLD (78).

Au contraire, une invalidation de PPAR- $\gamma$  au niveau des hépatocytes ou des cellules de Kupffer entraîne une stéatose exacerbée et augmentent les concentrations hépatiques en TG (79). PPAR- $\gamma$  semble donc être un facteur stéatosique. Cependant le rôle précis de PPAR- $\gamma$ , facteur causal ou conséquence de la stéatose, est encore controversé contrairement à son rôle déjà avéré dans la NASH.

Ces différents facteurs de transcription régulés par l'insuline, activateurs ou inhibiteurs, sont donc des médiateurs essentiels dans le contrôle de la synthèse hépatique de lipides *in vivo*. Dans la NAFLD, leur activation exacerbée et la régulation négative des inhibiteurs permet l'augmentation de la lipogenèse *de novo*, qui accompagnée de la diminution de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale, entraîne l'accumulation des lipides conduisant à la stéatose.

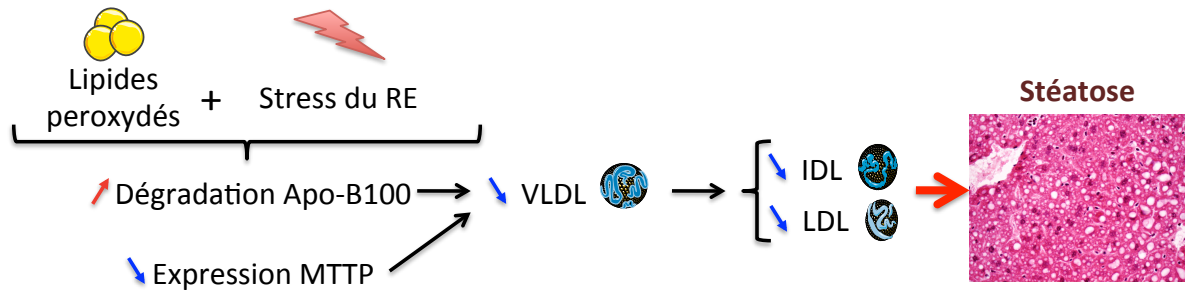
#### **IV.4.2. Dérégulation de l'import-export des lipides**

Chez un patient sain, la sécrétion des VLDL, lipoprotéines permettant le transport du foie vers les organes périphériques, est proportionnelle à la concentration des TG. Il a été montré que ce taux de sécrétion est augmenté chez les patients ayant une NAFLD (59). Cependant cette augmentation des VLDL n'est pas suffisante pour expliquer la disponibilité accrue de TG dans le foie. En effet, il a été montré que la capacité de ces patients à sécréter des VLDL était limitée lorsque l'infiltration hépatique par les TG dépassait 10 % (80). Cette altération de la sécrétion de VLDL chez les patients ayant une NAFLD s'explique, en partie, par l'altération de la synthèse de l'Apo-B100.

Effectivement, le maintien de l'homéostasie du RE permet la sécrétion de l'Apo-B100 et réduit également le développement de la stéatose (81).

La souris Shionogi, qui développe une stéatose hépatique spontanée, présente un défaut d'export des VLDL associé à la diminution de l'expression de la protéine MTTP. La surexpression de cette MTTP dans le modèle murin permet l'amélioration de la stéatose (82). Cette altération de synthèse de l'Apo-B100 peut être entraînée par l'augmentation de la peroxydation lipidique causée par l'excès des AGL. En effet, la présence des lipides peroxydés et le stress du RE ont un effet synergique qui induit une augmentation de la dégradation par protéolyse de l'Apo-B100 et diminue ainsi la sécrétion des VLDL (83).

Ainsi un défaut de synthèse de l'Apo-B100 ou de la MTTP altère l'export des VLDL et participe au développement de la stéatose (figure 30).



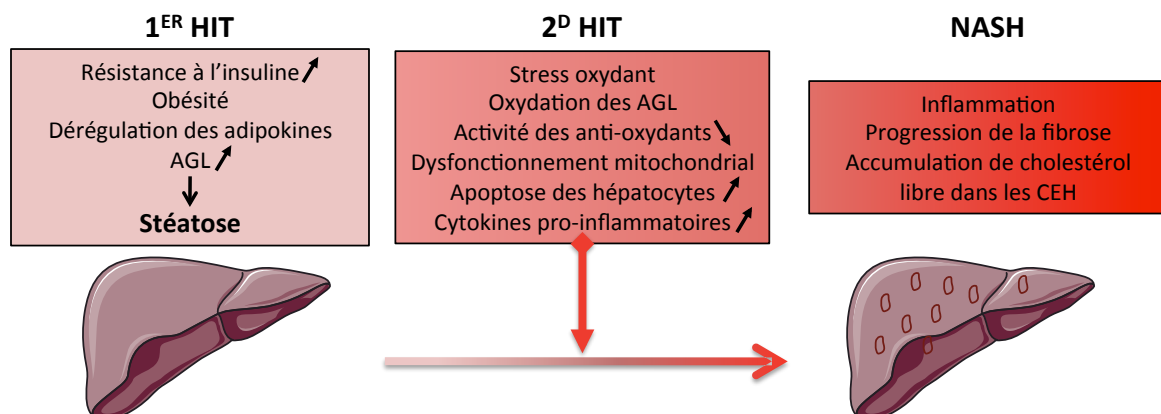
**Figure 30 : Altération de l'Apo-B 100 et de la MTTP au cours de la stéatose**

Les lipides oxydés et le stress du réticulum endoplasmique (RE) entraînent l'augmentation de la dégradation de l'Apo-B100 et la diminution de l'expression de la protéine MTTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein). Ceci conduit à la diminution de l'export des VLDL, IDL et LDL.

## IV.5. De la stéatose à la NASH

### IV.5.1. La théorie des deux hits

Les mécanismes physiopathologiques expliquant le passage de la stéatose à l'inflammation hépatique, la NASH, ne sont encore pas tous compris. La théorie des deux étapes ou des deux hits suggérerait un passage séquentiel de la stéatose à la NASH (58). Dans cette hypothèse, la première étape de la pathologie est la stéatose. Les changements causés lors de la stéatose fragilisent les hépatocytes et rendent le foie plus sensible aux agressions (figure 31).



**Figure 31 : Théorie des deux hits**

De nombreux éléments fragilisent le foie et participent à l'installation du premier hit : la stéatose. Puis le deuxième hit est caractérisé essentiellement par un stress oxydant, puis une peroxydation lipidique qui sont probablement responsables de l'inflammation dans la NASH (Non Alcoholic SteatoHepatitis), de l'apparition de la fibrose hépatique et des lésions cellulaires associées comme l'accumulation de cholestérol dans les cellules étoilées (CEH). Adapté de James et al, 1998 (58).

La seconde étape regroupe différents facteurs comme l'augmentation des endotoxines et des cytokines pro-inflammatoires, l'augmentation de l'apoptose des hépatocytes et l'installation du stress oxydant associée au dysfonctionnement mitochondrial. Ces différents facteurs entraînent une réponse inflammatoire et la progression des dommages délétères hépatiques. Tout ceci conduit à l'installation de la stéatohépatite non alcoolique NASH (pour l'anglais *Non Alcoholic SteatoHepatitis*) (figure 31).

L'ensemble des données actuelles montre que la pathologie ne s'installe pas de façon dichotomique comme le décrit cette théorie. Les différents facteurs énumérés dans les deux étapes surviennent de façon concomitante. Avec la théorie des « multiples étapes parallèles » (84), le rôle du TA, du stress oxydant et de mécanismes récemment identifiés comme le stress du RE et l'autophagie ont un peu amélioré la compréhension des dysfonctions lors de la NASH.

#### ***IV.5.2. Mécanismes participant à la NASH***

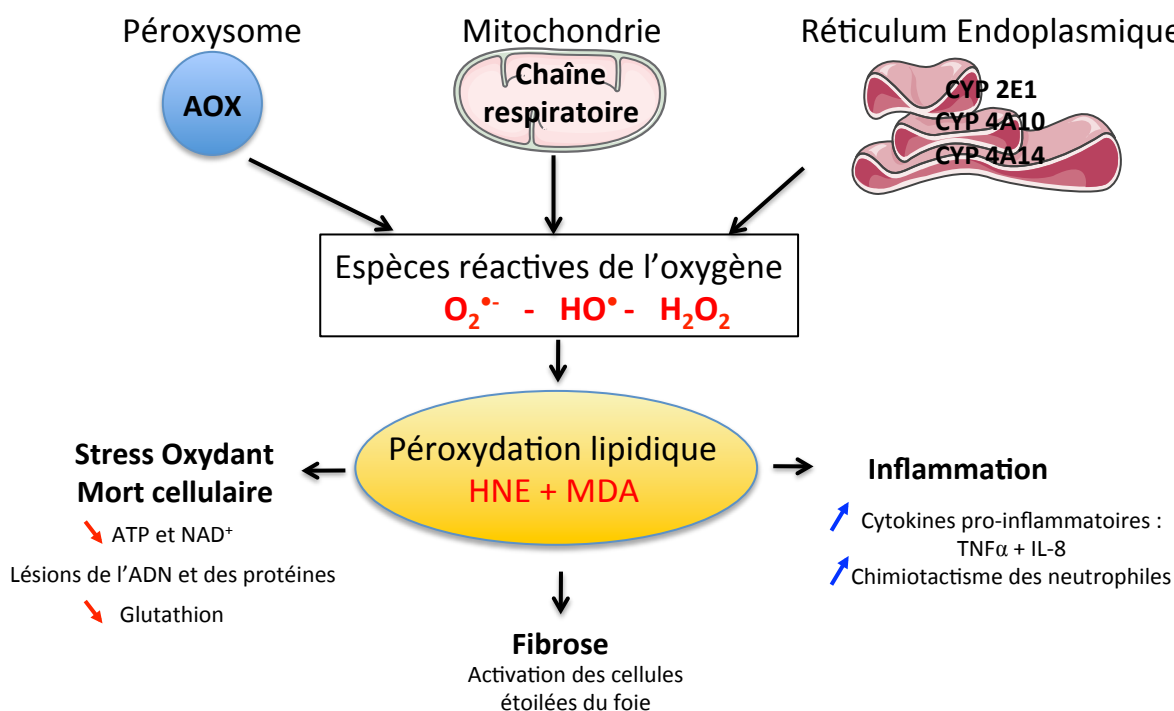
##### ***Stress oxydant et peroxydation lipidique causés par la NAFLD***

Si le débit d'électrons est interrompu à tout point de la chaîne respiratoire, les ROS produits peuvent transférer des électrons à l'oxygène moléculaire pour produire des anions superoxydes ( $O_2^{\bullet-}$ ), qui est ensuite converti par la superoxyde dismutase en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (85). L' $H_2O_2$  est à son tour converti en eau par la glutathion peroxydase ou en présence de cations divalents tels que le fer, l' $H_2O_2$  peut produire le radical hydroxyle  $HO^{\bullet}$ .

Le stress oxydant est un état d'agression décrivant ce déséquilibre engendré présentant une diminution des défenses anti-oxydantes de la cellule au profit d'une augmentation des espèces oxydantes, les ROS et les RNS.

La production augmentée d'AG, les défauts dans la  $\beta$ -oxydation mitochondriale associés au dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale chez les patients ayant une NAFLD peuvent directement conduire à ce stress oxydant (58). Dans des modèles animaux et chez des patients ayant une NASH, il a été observé une production plus importante de ROS (70) (figure 32).





**Figure 32 : Stress et peroxydation lipidique**

Les oxydations se produisent dans les peroxyosomes et les mitochondries. L'action des cytochromes (CYP) entraîne la production massive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Différents facteurs sont impliqués dans l'installation de ce stress oxydant. La  $\beta$ -oxydation est une source de ROS, mais l'accumulation des AG dans le cytosol entraîne aussi l'activation des voies alternatives d'oxydation dans les peroxyosomes et le RE, qui sont des sources supplémentaires de production de ROS. Le CYP2E1 qui est impliqué dans l'oxydation microsomale, voit son expression et son activité augmentées chez les patients ayant une NASH (86).

Avec l'inhibition des complexes de la chaîne respiratoire dans la NAFLD, le transfert indépendant d'électrons à l'oxygène est facilité et accroît ainsi la production de l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ). Par ailleurs, les ROS sont des molécules à durée de vie relativement limitée qui exercent des effets néfastes locaux. Les AG polyinsaturés sont très sensibles à la peroxydation oxydative par les ROS. A la suite de cette peroxydation, les produits sont le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonénal (HNE). Ces aldéhydes, qui sont cytotoxiques, ont une durée de vie plus longue que les ROS. Ils peuvent diffuser librement dans l'espace extracellulaire et atteindre des cellules voisines et amplifier ainsi les effets délétères du stress oxydant (87). Les ROS et les aldéhydes issus de la peroxydation des AG polyinsaturés peuvent induire un stress oxydant et la mort cellulaire via une déplétion en ATP et en  $NAD^+$ .

Leurs effets délétères sont notamment dus aux dommages de l'ADN, des altérations de la synthèse et de la stabilité des protéines. En outre, ils augmentent la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  par les cellules de Kupffer (88) (figure 32). Le HNE et le MDA sont eux-mêmes de puissants chimio-attractants pour les neutrophiles (89). Enfin les ROS et les produits de la peroxydation lipidique peuvent également activer les CEH et stimuler la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire (90). De cette façon, le stress oxydant peut directement contribuer à la mort hépatocytaire, l'inflammation et la fibrose et donc à l'aggravation de la NAFLD.

De nombreuses études aussi bien chez l'Homme que chez l'animal, ont mis en évidence cette association entre la NASH, le stress oxydant et la peroxydation lipidique (61). Par exemple, le niveau de 3-nitrotyrosine, un marqueur de l'oxydation des protéines, est augmenté dans le foie des patients présentant une NAFLD et est supérieur chez les patients atteints de NASH comparativement aux patients ayant uniquement un foie stéatosique (91). Les expressions hépatiques des marqueurs de peroxydation lipidique avec le HNE et des dommages oxydatifs de l'ADN avec le 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) sont également corrélées à la sévérité de la nécro-inflammation et de la fibrose chez des patients atteints de NAFLD (92). D'autres études ont montré une augmentation des produits de la peroxydation lipidique au niveau systémique chez les patients présentant une NASH (93) ainsi qu'une déplétion en anti-oxydants chez les patients atteints de NAFLD (94). Ces données confirment ainsi que le stress oxydant et la peroxydation lipidique participent activement aux dommages hépatiques et à la progression de la NAFLD.

### ***Stress du réticulum endoplasmique***

Le RE est impliqué dans la synthèse, la maturation et l'exportation des protéines cellulaires et en particulier les protéines membranaires et les protéines sécrétées (95). Des dérégulations de l'homéostasie protéique peuvent engendrer une accumulation de protéines dans le RE associée à une altération de leur maturation et de leur repliement. La conséquence est une diminution de la synthèse protéique et cette réponse cellulaire appelée UPR (pour l'anglais *Unfolded Protein Response*) détermine ce qui a été défini comme le stress du RE.

Au cours de la NAFLD, l'apport massif d'AG en particulier saturés, l'activation de la lipogenèse et le développement de l'insulino-resistance entraînent une diminution de l'efficacité des fonctions du RE. L'UPR va mettre en œuvre une signalisation cellulaire via les voies protéiques PERK (pour l'anglais *Proline-rich, Extensin-like Receptor Kinase*) et IRE1 (pour l'anglais *IFN-stimulated Response Element*). Cette signalisation va aboutir à une sollicitation anormale des mitochondries associée à une augmentation de la production de ROS et à l'activation de la voie apoptotique (96). Le stress du RE va engendrer une diminution de la sécrétion des lipides, en particulier l'Apo-B et des dérégulations des gènes de la lipogenèse installant un cercle vicieux qui favorise la stéatose. En effet, des études ont montré que l'activation du stress du RE entraîne une augmentation de la lipogenèse et a été directement relié à la NAFLD dans des modèles murins (97).

Le stress du RE altèrent l'homéostasie lipidique et participent à la stéatose et à l'aggravation de la NAFLD. Le stress du RE est désormais identifié comme un acteur dans l'aggravation de l'inflammation (98).

### ***Autophagie du foie***

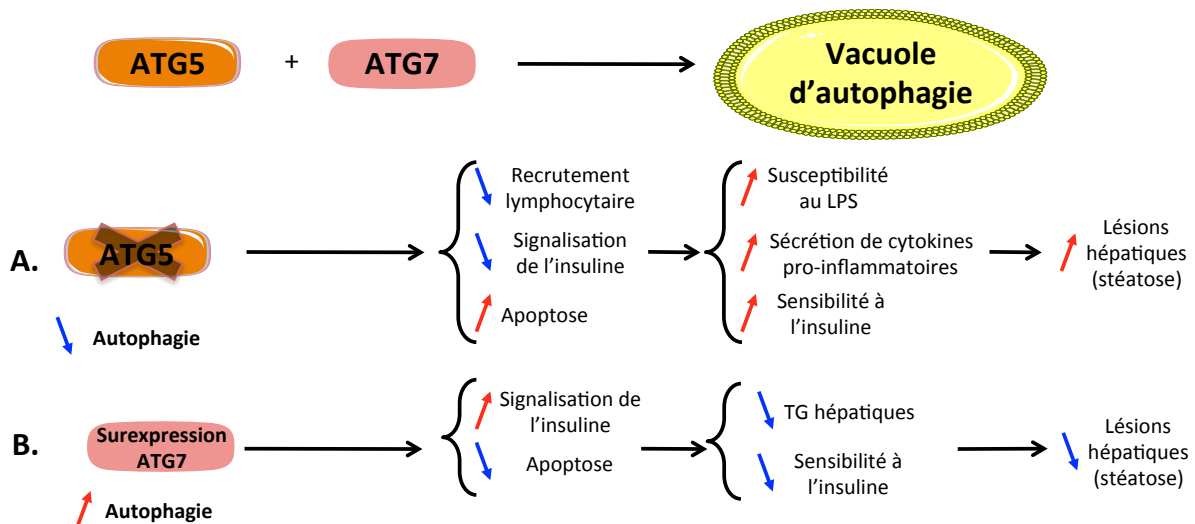
L'autophagie est un processus cellulaire essentiel catabolique qui cible les constituants cellulaires, tels que des organites endommagés, des protéines dépliées et des pathogènes intracellulaires, vers les lysosomes pour la dégradation afin de permettre le renouvellement cellulaire (99). Ce processus fait intervenir une machinerie protéique complexe au cours duquel les protéines de la famille ATG (pour l'anglais *Autophagy Related Gene*) vont orchestrer le processus.

Au niveau du foie, les protéines ATG, notamment ATG5 et ATG7, peuvent interagir avec les gouttelettes lipidiques en excès dans les hépatocytes pour former des vacuoles d'autophagie, la lipophagie (100). Dans des modèles cellulaires *in vitro* et *in vivo*, il a été montré que la présence de gouttelettes lipidiques inhibait la protéine ATG5 et donc la formation des vacuoles d'autophagie. *In vivo*, cette diminution de l'autophagie entraîne une augmentation significative de la quantité de TG accumulés dans les hépatocytes et donc une aggravation de la stéatose.

Dans la NAFLD, une diminution de l'autophagie dans les hépatocytes est observée (101). En effet, des études récentes sur un modèle de souris déficientes en ATG5 (ATG5<sup>-/-</sup>) dans la lignée myéloïde dont les monocytes/macrophages, a souligné l'importance de l'autophagie assurée par les cellules de Kupffer. Ainsi, les KC isolées de souris ATG5<sup>-/-</sup> présentant une diminution de l'autophagie, sont plus sensibles à une induction par le LPS et sécrètent plus de cytokines pro-inflammatoires et de ROS que leurs homologues contrôles. En d'autres termes, les KC issues des souris ATG5<sup>-/-</sup>, chez qui l'autophagie est inhibée, sont plus polarisées dans une réponse pro-inflammatoire. Ces résultats suggèrent que l'autophagie participe au rétrocontrôle négatif de l'activation des KC (102). Par ailleurs, la KC a aussi un impact sur l'autophagie. Une étude a récemment montré que la déplétion en KC dans un modèle murin d'obésité est associée à une augmentation du processus d'autophagie hépatique et diminue l'aggravation des lésions hépatiques (103).

Le rôle de l'autophagie dans un modèle murin de fibrose hépatique a également été observé. La diminution de l'autophagie chez les souris ATG5<sup>-/-</sup> entraîne une augmentation du recrutement leucocytaire et de l'apoptose des hépatocytes et aggrave des lésions fibrotiques (102).

Inversement, une surexpression hépatique dans des souris obèses d'une autre protéine de l'autophagie, ATG7 entraîne une diminution de l'accumulation des gouttelettes lipidiques et par conséquent de la quantité de TG hépatiques. Ces résultats montrent qu'une activation de l'autophagie est un moyen de modérer le stockage des lipides dans le foie et la stéatose (figure 33) (104).



**Figure 33 : Importance de l'autophagie dans la stéatose**

A. La déficience d'ATG5 entraîne une diminution de l'autophagie qui conduit à l'augmentation des lésions hépatiques. B. La surexpression de l'ATG7 permet une augmentation de l'autophagie qui améliore la signalisation à l'insuline et diminue les lésions hépatiques.

L'association de ces résultats est en faveur d'un rôle hépatoprotecteur de l'autophagie. L'autophagie dans le foie, entre autre régulée par les KC, semble jouer un rôle important dans les différents stades de la NAFLD mais également dans la MAF (105, 106). Cependant, le rôle anti-fibrogénique de l'autophagie est controversé car il montre que l'autophagie a aussi un rôle pro-fibrogénique dans les cellules étoilées hépatiques (105).

Les mécanismes qui vont être impliqués dans l'initiation de la NASH sont donc extrêmement complexes et variés. Tous ces mécanismes ne sont vraisemblablement pas enclenchés de la même manière chez tous les patients. Il est actuellement difficile de trancher quand au fait que certains de ces évènements sont plus délétères que d'autres et lequel de ces évènements serait le plus judicieux à cibler. Néanmoins, la compréhension de ces mécanismes reste essentielle pour dégager de nouvelles pistes thérapeutiques.

## IV.6. Perturbations immunitaires au cours de la NAFLD

### IV.6.1. Les lymphocytes dans la NAFLD

Le foie, décrit par certains comme un organe lymphoïde secondaire, est un organe tolérogène (107). Ceci lui confère une capacité à ne pas induire d'inflammation ou de réponse immunitaire intempestive, comme cela a été décrit dans le chapitre II. Les dérégulations métaboliques associées à la NAFLD sont caractérisées au stade de la NASH par des infiltrats inflammatoires, signe d'une inflammation. Un certain nombre d'études montrent que les dérégulations métaboliques vont favoriser une dysfonction de la tolérance immunitaire hépatique.

La stéatose hépatique a été associée à une diminution du pourcentage des lymphocytes NKT hépatiques (108). Les lymphocytes hépatiques NKT représentent 21 % des cellules mononuclées du foie chez des souris contrôles alors que ces NKT sont réduits à 4 % chez des souris obèses (*ob/ob*). Cette réduction est confirmée dans différents modèles de stéatose hépatique induite par des régimes hypercaloriques (109). Chez l'Homme, l'analyse de biopsies de foie de patients atteints de NAFLD révèle une corrélation entre cette diminution de lymphocytes NKT et la sévérité de la stéatose (110). L'accumulation et la nature des lipides hépatiques est directement responsable de la réduction du nombre de lymphocytes NKT au cours de la stéatose dans la NAFLD. En effet, des régimes enrichis en acides gras saturés ou mono-insaturés engendrent une déplétion des lymphocytes NKT hépatiques contrairement aux acides gras polyinsaturés qui n'ont pas d'effet (111).

Pour évaluer le rôle potentiel des lymphocytes NKT dans la NASH, des transferts adoptifs de lymphocytes NKT ont été réalisés chez des souris receveuses *ob/ob*. Après seulement douze jours de transfert de NKT, une diminution de la stéatose est constatée ainsi qu'une amélioration du taux des transaminases et de la tolérance au glucose. La restauration du nombre de lymphocytes NKT permet donc d'améliorer les lésions hépatiques mais également les dérégulations métaboliques associées à l'obésité (112).

D'autre part, la réduction ou la déplétion des lymphocytes NKT contribue à la perturbation de la balance cytokinique (110). La réduction des NKT hépatiques est corrélée à l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires dans le foie stéatosique.

La réduction du nombre de lymphocytes NKT hépatiques dans un contexte d'obésité est liée à une augmentation de leur apoptose qui pourrait provenir de la sécrétion augmentée d'IL-12 par les KC.

Inversement à ce qui a été décrit dans la NASH, des études récentes montrent que les lymphocytes NKT pourraient s'accumuler au stade de la fibrose (113). En effet, dans un modèle murin de fibrose induit par un régime déficient en méthionine et choline, on observe une augmentation du pourcentage de lymphocytes NKT. Ces données, *a priori* contradictoires, entre la diminution du nombre de NKT dans l'inflammation hépatique et leur augmentation dans la fibrose, pourraient être liées aux modèles expérimentaux utilisés qui sont différents. En effet, il n'a jamais été montré dans le modèle de NASH induit par un régime déficient en méthionine et choline que le nombre de NKT est réduit au stade de la NASH. Cependant, chez des patients souffrant de NAFLD, le nombre de lymphocytes NKT hépatiques est corrélé au stade de fibrose (113). Les lymphocytes NKT seraient donc dans un premier temps diminués par une exacerbation de leur apoptose induite par la stéatose puis l'environnement immunitaire induit par la NASH pourrait favoriser leur augmentation.

La stéatose hépatique induite par un régime hyperlipidique est associée à une déplétion de Trég qui conduit à une augmentation de l'activité de la voie du TNF- $\alpha$  dans le foie. Après l'administration de LPS, les souris nourries avec un régime hyperlipidique développent une inflammation qui est diminuée par le transfert adoptif de Trég (114).

Par ces techniques de transferts adoptifs, il a également été mis en évidence que les lymphocytes B et T provenant de souris obèses ont une capacité plus importante à migrer spécifiquement vers le foie que les lymphocytes issus de souris saines. Ces propriétés sont potentialisées par le LPS mais n'en dépendent pas. En plus de ce défaut immunitaire directement lié aux lymphocytes lorsqu'ils proviennent de souris obèses, il a été montré que le foie stéatosique engendre un recrutement augmenté de lymphocytes B et T participant à l'infiltrat inflammatoire dans la NASH (115). Ces résultats indiquent que la NASH est associée à une modification des sous-populations de lymphocytes T dans le foie ainsi qu'à une polarisation de la réponse immunitaire vers un phénotype pro-inflammatoire. Bien que la stéatose soit considérée comme bénigne, le foie stéatosique engendre un recrutement augmenté de lymphocytes.

Lors de la fibrose, outre la perturbation du pool de NKT, les différentes sous-populations lymphocytaires T participent également à l'aggravation de la pathologie. Une fibrose a été induite par des injections répétées de tétrachlorure de carbone ( $\text{CCl}_4$ ) soit chez des souris de fond génétique C57Bl/6, qui développent une réponse immunitaire de type pro-inflammatoire (Th1), soit chez des souris de fond génétique BALB/c qui développent plutôt une réponse immunitaire de type anti-inflammatoire (Th2). Les souris C57Bl/6 développent une fibrose moins grave que les souris BALB/c. Chez les souris BALB/c lorsque la réponse Th2 est inhibée par des anticorps anti-IL-4 ou par de l'IFN- $\gamma$ , la fibrose est améliorée (116).

De plus, les lymphocytes  $\text{CD8}^+$  peuvent également moduler le processus de fibrogenèse. Des souris présentant une immunodéficiência combinée sévère, les souris SCID (pour l'anglais *Severe Combined immuno Deficiency*), traitées au  $\text{CCl}_4$  ne développent une fibrose que si elles ont reçues par transfert adoptif des lymphocytes T  $\text{CD8}^+$  (117). Une autre étude a mis en évidence que ce rôle pro-fibrogénique des lymphocytes T  $\text{CD8}^+$  serait dû à une activation des cellules étoilées (118). Dans un modèle de souris déficientes en lymphocytes B, le déclenchement d'une fibrose par le  $\text{CCl}_4$  est diminuée comparativement à des souris témoins, montrant ainsi que les lymphocytes B participent aussi à la fibrogenèse (119).

L'ensemble de ces données montre que la réponse immunitaire est une composante obligatoire au cours de la NAFLD et que l'état métabolique du foie participe à ces dérégulations immunitaires.

#### **IV.6.2. La cellule de Kupffer, un rôle clé dans la NASH**

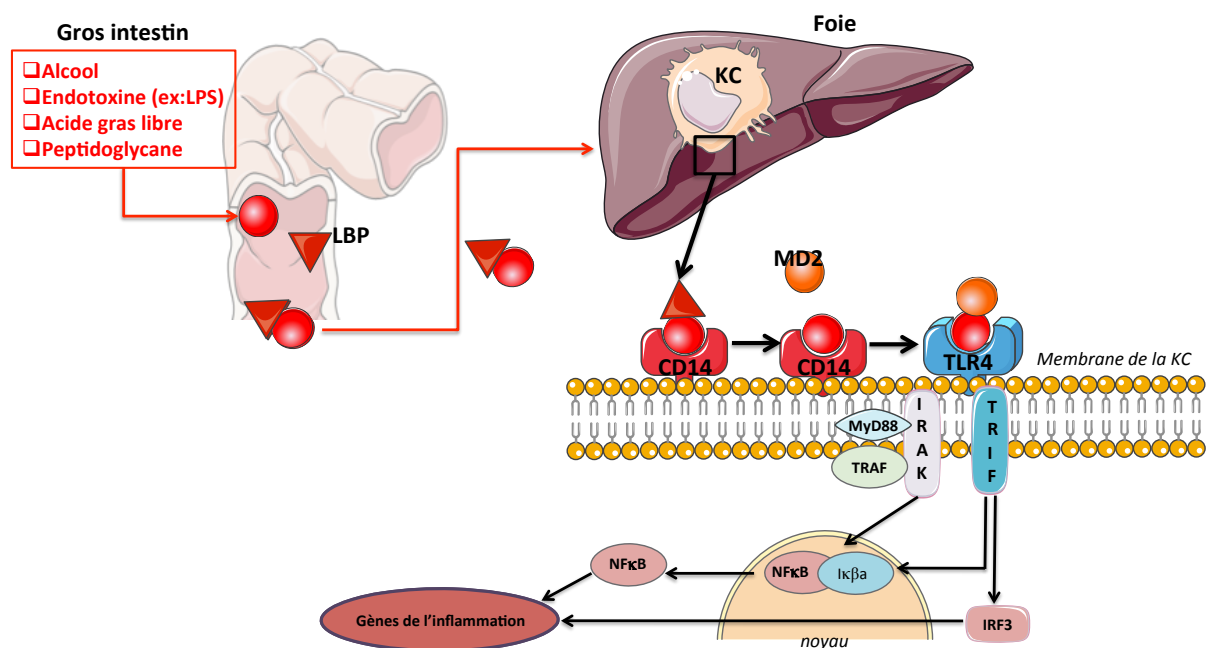
Les cellules de Kupffer sont capables de moduler l'inflammation hépatique par différentes voies de signalisation. Il a été montré que les KC sont recrutées et activées chez les souris atteintes de NASH par rapport aux souris saines (120). Chez l'Homme, l'augmentation du nombre de KC est également corrélée à la sévérité histologique de la NAFLD. Une augmentation du nombre de KC chez les patients atteints de NASH est ainsi constatée par rapport aux personnes présentant une simple stéatose (121).



De plus, une hétérogénéité zonale des KC est observée chez les patients atteints de NAFLD. Des agrégats de grandes KC sont identifiés dans les régions périportales du foie des personnes ayant une NASH alors que leur distribution est diffuse en cas de simple stéatose (122).

L'importance des KC dans la stéatose et la NASH a été mise en évidence grâce des expériences utilisant des modèles murins d'obésité déplétés en KC par un traitement au chlorure de gadolinium (123) ou par injection intraveineuse de liposomes chargés en clodronate (124). Dans les deux cas, la déplétion en KC améliore considérablement la sensibilité à l'insuline hépatique, l'hyperglycémie à jeun et la tolérance au glucose. L'amélioration de ces paramètres métaboliques est associée à une diminution du développement de la stéatose hépatique, mais aussi à une réduction du poids corporel et du TA. Ceci suggère une communication étroite entre le foie et le tissu adipeux dans le développement des altérations métaboliques lors de l'obésité induite par un régime hyperlipidique (125). Cependant, la destruction des KC les dix derniers jours de régimes, c'est-à-dire quand la pathologie est déjà bien installée, ne permet pas d'améliorer la NAFLD suggérant que les KC jouent un rôle essentiel dans les étapes précoces de la pathologie.

L'activation des KC dans la NASH passe en partie par l'activation du TLR 4 (126). En effet, le TLR 4 est nécessaire pour le développement de l'obésité induite par l'alimentation et la résistance à l'insuline (127). La présence accrue du LPS entraîne une augmentation de l'activation du TLR 4 par les KC (128). De façon plus précise, la protéine de liaison au LPS, la LBP (pour l'anglais *LPS Binding Protein*) présente dans le sang, prend en charge le LPS. Le complexe LBP/LPS est ensuite présenté au récepteur CD14 situé à la surface des KC. Les KC expriment relativement peu de molécules CD14 à leur surface en condition non pathologique (129). Cependant, de nombreux stimuli y compris les endotoxines (130) ou la consommation excessive d'alcool (131), peuvent conduire à une augmentation des niveaux de CD14 à la membrane. Le CD14 transfère ensuite le LPS à la molécule adaptatrice MD-2 (pour l'anglais *Myeloid Differentiation 2*) qui peut interagir avec le TLR 4 (132).



**Figure 34 : Schéma de la signalisation de TLR 4 dans les cellules de Kupffer**

Les éléments pathogènes (encadré rouge) sont reconnus et pris en charge par la protéine de liaison du LPS (LBP). La LBP apporte l'élément pathogène au récepteur CD14. La molécule adaptatrice MD2 (pour l'anglais *Myeloid Differentiation 2*) va transférer le LPS au TLR 4 et permettre l'activation des voies de signalisation inflammatoires médiées par TRIF et Myd88.

L'assemblage du complexe TLR 4-MD2-LPS (figure 34) va entraîner l'activation de la voie de signalisation dépendante de MyD88 (pour l'anglais *Myeloid differentiation 88*) et de TRIF (pour l'anglais *TIR domain containing adapter inducing interferon  $\beta$* ). La voie de MyD88 induit la synthèse de cytokines pro-inflammatoires à travers l'activation de NFκB (pour l'anglais *Nuclear Factor  $\kappa$  B*), alors que la voie de TRIF active non seulement la voie NFκB mais également celle de l'IRF3 (pour l'anglais *Interferon Regulatory Factor 3*) induisant ainsi une production d'IFN- $\beta$  et de cytokines pro-inflammatoires, qui participent aux dommages hépatiques (133). Si un élément de cette voie de signalisation est modifié, comme le TLR 4, MD2 ou le CD14, la signalisation du TLR 4 n'est pas effective et les souris sont alors protégées de la NASH (134, 135). Nous reviendrons sur cette voie de signalisation dans le chapitre suivant (figure 43).

Des données expérimentales et cliniques ont montré que le niveau circulant systémique et hépatique d'endotoxines est élevé dans la NAFLD (136-138). Cette augmentation est liée à l'altération de la barrière intestinale, soit translocation bactérienne de l'intestin vers le foie et explique en partie l'activation des KC lors de la NASH.



## Chapitre V. Les hépatopathies métaboliques liées à l'alcoolisme ou MAF

### V.1. Définition

L'alcool est la substance psychoactive la plus consommée en France. La dépendance à l'alcool, l'alcoolisme, est reconnue par l'OMS comme une pathologie à part entière. La consommation d'alcool est associée à des troubles du comportement et à des troubles mentaux. On peut voir une tolérance s'établir poussant le consommateur à augmenter les doses d'alcool consommées. La progression vers l'alcoolisme est lente et se fait en trois temps : l'usage d'alcool sans dommage, l'usage à risque et nocif sans la dépendance pour finir par la dépendance. Il existe alors dans cette maladie une dépendance autant physique que psychique dont les effets sont observés en période de sevrage.

L'OMS relate une augmentation de la consommation d'alcool mondiale depuis le début du XXI<sup>e</sup> siècle. La consommation d'alcool varie en fonction des habitudes culturelles des pays. On peut voir une corrélation entre la situation économique du pays et la consommation d'alcool : plus le pays est développé plus la consommation y augmente (en volume d'alcool). D'après les statistiques de 2014 de l'OMS (139), la France est en 18<sup>e</sup> position pour sa consommation d'alcool, avec une consommation massive de vin. Si la France n'occupe plus la tête du classement européen en termes de consommation d'alcool, elle demeure tout de même dans le groupe des pays les plus consommateurs. En France, en 2014, 86 % des personnes comprises dans la tranche d'âge de 15 à 75 ans déclarent avoir consommé de l'alcool dans l'année, avec une consommation de 5,5 verres bus par semaine en moyenne. Bien que cette consommation soit stable depuis 2010, il s'avère que les alcoolisations ponctuelles importantes (binge drinking) sont en hausse et sont passées de 36 % à 38 % entre 2010 et 2014 (140).

La consommation excessive d'alcool entraîne près de 3,3 millions de décès chaque année dans le monde, soit environ 6 % des décès (56). En France, la consommation d'alcool est la deuxième cause de mortalité évitable après le tabagisme.

En effet, la consommation d'alcool est responsable directement ou indirectement de 14 % des décès de français et de 3 % des décès de françaises.

La part des décès due à l'alcool est la plus importante chez les 15- 34 ans (141). Les trois causes de décès où l'alcool est l'unique ou le principal facteur de risque sont la cirrhose, le cancer des voies aérodigestives conjointement avec le tabagisme (142) et les maladies mentales liées à la consommation d'alcool. Toute consommation régulière peut, chez les personnes présentant une vulnérabilité, conduire à une dépendance qui peut avoir des effets pathologiques.

La consommation d'alcool peut être évaluée en grammes d'alcool pur consommé ou son équivalent en nombre de verres standard. En Europe, notamment en France, un verre standard contient 10 g d'alcool (figure 35).



**Figure 35 : Equivalence de l'unité d'alcool en quantité de verre**

*Une unité d'alcool correspond à 10 grammes d'alcool dans la plupart des pays. L'unité d'alcool définit les verres standards de débit de boisson tels que le vin, la bière, etc ... Sources institut de recherche scientifique sur les boissons alcoolisées (IREB).*

L'OMS a défini le niveau de consommation à ne pas dépasser comme étant de :

- 20 g par jour : 2 verres chez la femme
- 30 g par jour : 3 verres chez l'homme (143)

L'alcoolisme excessif et chronique est reconnu depuis longtemps pour engendrer le développement de dommages hépatiques.

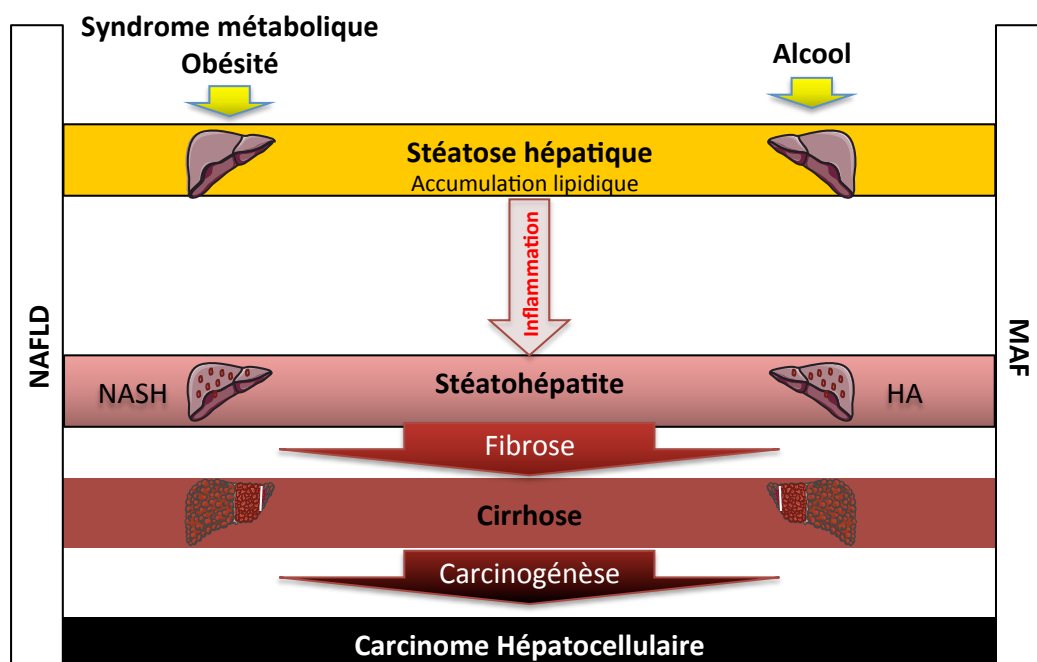
Le risque relatif de développer une cirrhose alcoolique lors de l'alcoolisation nocive correspond à une consommation moyenne régulière d'alcool supérieure à:

- 30 g par jour pour les femmes
- 60 g par jour pour les hommes

Chez l'homme, une consommation de 60 g d'alcool par jour multiplie le risque de développer une cirrhose hépatique par cinq (144). Il est à noter que quelque soit le niveau de consommation d'alcool, la maladie se développe plus rapidement chez la femme (10 ans) que chez l'homme (15 ans) (145).

## V.2. Développement de la MAF

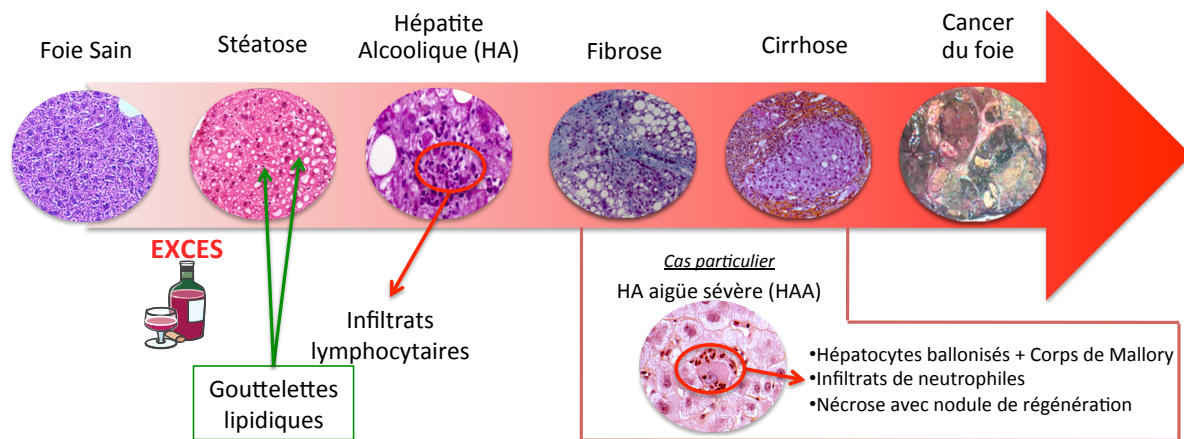
La maladie alcoolique du foie représente un spectre de modifications morphologiques qui sont similaires à celles décrites pour la NAFLD. D'un point de vue historique, ces descriptions anatomo-pathologiques ont d'ailleurs été observées dans la MAF bien avant qu'on ne parle de NAFLD. Malgré de nombreux points communs entre ces deux pathologies, notamment les caractéristiques histologiques, certaines caractéristiques sont spécifiquement retrouvées dans la MAF et en particulier dans l'hépatite alcoolique aigüe sévère (HAA) (figure 36).



**Figure 36 : Homologies entre NAFLD et MAF**

La NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease) et la MAF (maladie alcoolique du foie) présentent des caractéristiques similaires. NASH (Non alcoholic Steatohepatitis), HA (Hépatite Alcoolique)

La MAF regroupe l'ensemble des lésions allant de la stéatose à l'hépatite alcoolique, la fibrose, la cirrhose jusqu'au carcinome hépatocellulaire. Cependant au cours de la MAF, l'hépatite alcoolique (HA) peut présenter une forme aiguë et sévère associée à un risque vital chez le patient (figure 37).



**Figure 37 : Progression des stades au cours de la MAF**

*La consommation excessive d'alcool entraîne l'apparition de gouttelettes lipidiques au sein des hépatocytes, la stéatose. L'hépatite alcoolique est caractérisée par des infiltrats inflammatoires, et peut évoluer en une fibrose, une cirrhose et un carcinome hépatocellulaire. Dans certains cas, on observe une hépatite alcoolique aiguë sévère (HAA).*

La stéatose dans la MAF a les mêmes caractéristiques que celle rencontrée dans la NAFLD. Toutefois, contrairement à la NAFLD qui présente une stéatose plutôt macrovésiculaire, la MAF peut être autant macrovésiculaire que microvésiculaire. Les mécanismes responsables de cette stéatose mixte restent cependant peu clairs. Par ailleurs, quelques cas, rares, de stéatose microvésiculaire ont également été décrits au cours de la NAFLD (146).

Les effets de l'alcool sur la dérégulation du métabolisme des lipides dans le foie stéatosique avaient déjà été décrits en 1979 (147). Ces mêmes effets ont été décrits dans la NAFLD en 1980 en comparant des biopsies hépatiques de patients obèses et de patients alcooliques (148). La dérégulation du métabolisme lipidique est donc bien une constante dans ces pathologies hépatiques.

L'inflammation va engendrer des dommages cellulaires au cours desquels on observe une ballonnisation des hépatocytes est observée. Dans la MAF, cette ballonnisation caractérise l'HAA. On peut néanmoins l'observer, à un degré moindre dans la NASH.

L'HAA est définie histologiquement par l'association de la présence de ce « ballooning » au sein des hépatocytes accompagnée d'une nécrose hépatocytaire, d'une infiltration leucocytaire à polynucléaires neutrophiles et de corps de Mallory (149). La formation de corps de Mallory est la conséquence d'une profonde désorganisation du cytosquelette des hépatocytes. Les corps de Mallory sont des agrégats de filaments composés d'ubiquitine et de kératine au sein même du cytoplasme clarifié des hépatocytes (150). Ces corps de Mallory sont dus à la toxicité de l'alcool et donc associés spécifiquement à la MAF.

Le score de Maddrey, qui est un calcul différent de la MELD (chapitre IV, figure 25, pages 60), permet d'évaluer la fonction hépatique (151). Ce score tient compte du taux de prothrombine et de la concentration de bilirubine plasmatique (figure 38). Le pronostic d'une HAA va être posé si le score de Maddrey est supérieur à 32 et si les caractéristiques histologiques d'une HAA énumérées ci-dessus sont présentes.

$$\text{Score de Maddrey} = \frac{4,6 \times (\text{TP du malade} - \text{TP témoin}) + \text{Bilirubine}}{17}$$

**Figure 38 : Score de Maddrey**

*Le score de Maddrey permet d'évaluer la fonction hépatocytaire en tenant compte du taux de prothrombine (TP, en seconde) et de la capacité à éliminer la bilirubine (en µmol/L).*

L'HAA survient sur un foie déjà cirrhotique dans une très grande majorité de cas (environ 91 % des patients HAA sont cirrhotiques pour 9 % de patients non cirrhotiques (152). En général, à ce stade, l'inflammation persiste malgré l'arrêt de l'alcool (149). Ce stade de la pathologie présente un risque vital car ces patients présentent une défaillance hépatocytaire importante (infections, ascites, hémorragies ...). Le seul traitement disponible à ce jour est l'utilisation de glucocorticoïdes, dont l'efficacité n'est malheureusement pas égale chez tous les patients.

La survenue d'une cholestase intra-hépatique ainsi que la prolifération de canaux biliaires, qui ne sont pas caractéristiques de la NAFLD, peuvent être observées chez les patients atteints de forme sévère de MAF. La cholestase est caractérisée par une diminution de la production de bile et provoque une rétention intracellulaire des constituants biliaires, toxiques.



Comme les canaux biliaires sont obstrués, une accumulation du cholestérol dans le foie et une élévation des LDL et HDL plasmatiques est observée (153). Par ailleurs, l'obstruction des voies biliaires dans la MAF va avoir un effet sur le cycle entéro-hépatique des AB. Comme les AB primaires ne peuvent pas atteindre l'intestin et être déconjugés et transformés, une diminution drastique des quantités d'AB secondaires est observée.

Bien que la séquence des lésions anatomiques soit très proches dans la MAF et la NAFLD, hormis l'HAA, les perturbations métaboliques observées dans la MAF vont en partie être dues spécifiquement à la toxicité de l'alcool.

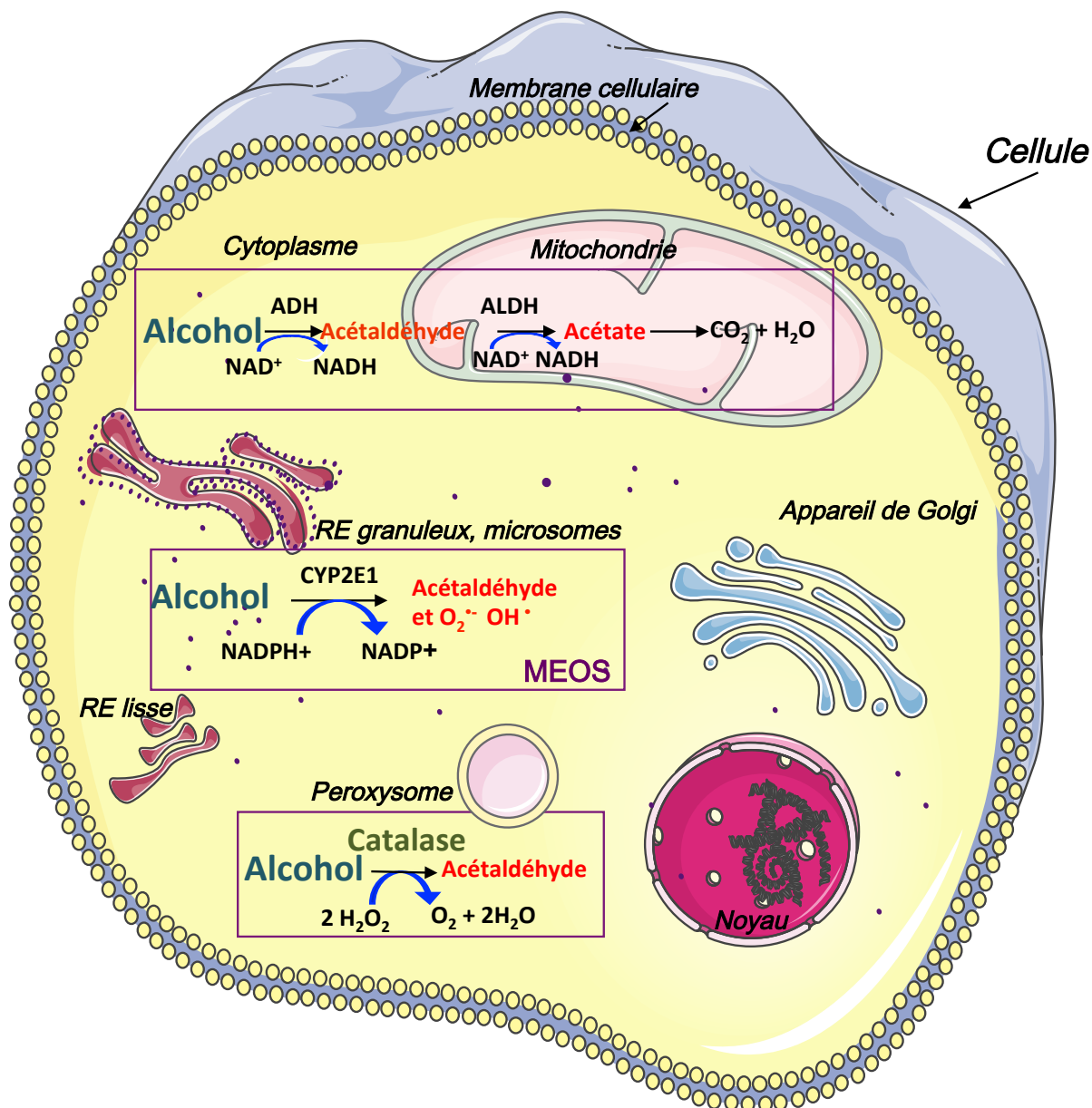
### **V.3. Perturbations métaboliques dues à la MAF**

L'alcool ingéré passe la barrière du tractus gastro-intestinal (TGI). La distribution de l'éthanol par la circulation sanguine est très rapide (demi-vie de distribution de 7 minutes environ) dans les organes très vascularisés comme le cerveau, le foie et les poumons. L'éthanol absorbé est ainsi éliminé par la sueur, les voies pulmonaires et urinaires (0,7 % à 1,5 %) ou bien métabolisé au niveau des organes (154).

Dans le TGI, 20 % de l'alcool est absorbé au niveau de l'estomac et 70 % au niveau de l'intestin grêle. Ainsi, la majorité de l'alcool ingéré est absorbé avant d'atteindre le colon. L'alcool est majoritairement métabolisé par le foie, puisque 80 % de l'éthanol y est dégradé, raison pour laquelle, le foie est une cible majeure des dégâts faits par l'alcool (155).

### V.3.1. Métabolisme hépatique de l'éthanol

Le métabolisme hépatique de l'alcool se déroule en deux étapes. L'alcool est d'abord transformé en acétaldéhyde puis ensuite en acétate (figure 39).



**Figure 39 : Métabolisme de l'éthanol**

L'alcool déshydrogénase (ADH) est la principale enzyme cytosolique qui convertit l'alcool en acétaldéhyde. L'enzyme CYP2E1 forme aussi l'acétaldéhyde au niveau des microsomes du réticulum endoplasmique (RE). Une faible partie de l'éthanol est métabolisé via la catalase. L'acétaldéhyde est ensuite oxydé en acétate par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH). Adapté de Cederbaum et al., 2012.

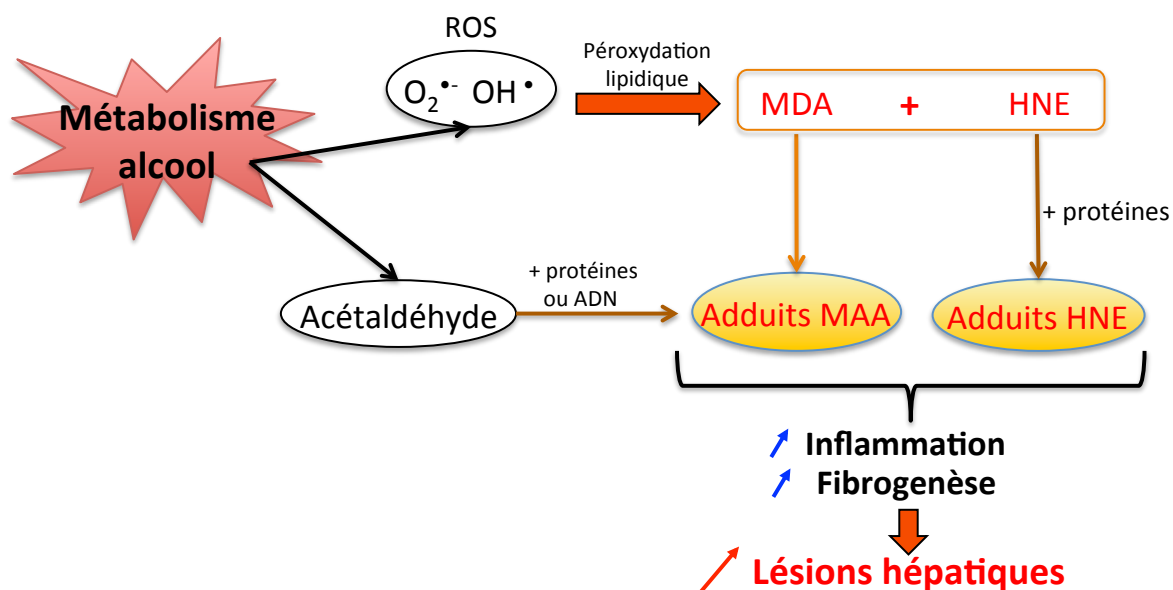
L'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde peut emprunter trois voies d'oxydations possibles (156) :

1. La voie de l'alcool déshydrogénase (ADH) est la voie prépondérante. L'ADH est une molécule très réactive qui possède 7 iso-enzymes connus (157). L'oxydation par l'ADH se localise dans le cytoplasme de l'hépatocyte.

2. La voie microsomale, appelé MEOS (pour l'anglais *Microsomal Ethanol Oxidizing System*) implique le cytochrome P450 2E1, plus connu sous le nom de CYP2E1. Cette oxydation est hautement inductible par la consommation d'alcool chez l'Homme. Une alcoolisation chronique induira une augmentation de CYP2E1, corrélée à une diminution de sa dégradation protéosomiale. Cette voie passant par CYP2E1 utilise la NADPH et l'oxygène comme cofacteurs. Cette voie d'oxydation s'accompagne d'une production de ROS qui vont participer à la toxicité de l'alcool (158).

3. La catalase est une enzyme retrouvée dans les péroxysomes de la cellule. La catalase va métaboliser l'alcool en utilisant du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). L'oxydation de l'alcool par cette voie reste cependant très faible (inférieure à 2 %) car les taux physiologiques de production d' $H_2O_2$  hépatique sont minimes. Cette voie de dégradation de l'alcool via la catalase est plus utilisée au niveau du cerveau. En effet, des études ont montré que l'inhibition de la catalase entraîne une diminution par le cerveau de l'oxydation de l'alcool en acétaldéhyde. L'acétaldéhyde provenant de la catalase dans le cerveau a été proposée pour jouer un rôle dans le développement de la tolérance à l'alcool, notamment par l'interaction avec les catécholamines (157).

L'acétaldéhyde est un métabolite très toxique car il est très réactif et forment des adduits avec les protéines et l'ADN. Ces adduits sont particulièrement nocifs pour la mitochondrie car il favorise la mort cellulaire en épuisant les stocks de glutathion réduit et en augmentant la peroxydation lipidique et les effets toxiques des radicaux libres. Ainsi, les adduits entraînent une augmentation de l'inflammation, de la fibrogenèse et des lésions hépatiques au cours de la MAF (figure 40). Par ailleurs, l'acétaldéhyde est également capable de traverser la barrière placentaire et participe ainsi au syndrome d'alcoolisation fœtale.



**Figure 40 : Les produits du métabolisme de l'alcool participent à la MAF**

*Le métabolisme de l'alcool produit des ROS qui participent à la peroxydation lipidique permettant la production de malondialdéhyde (MDA) et de 4-hydroxynonanal (HNE). L'acétaldéhyde peut réagir avec ces composés et former des adduits qui augmentent les lésions hépatiques.*

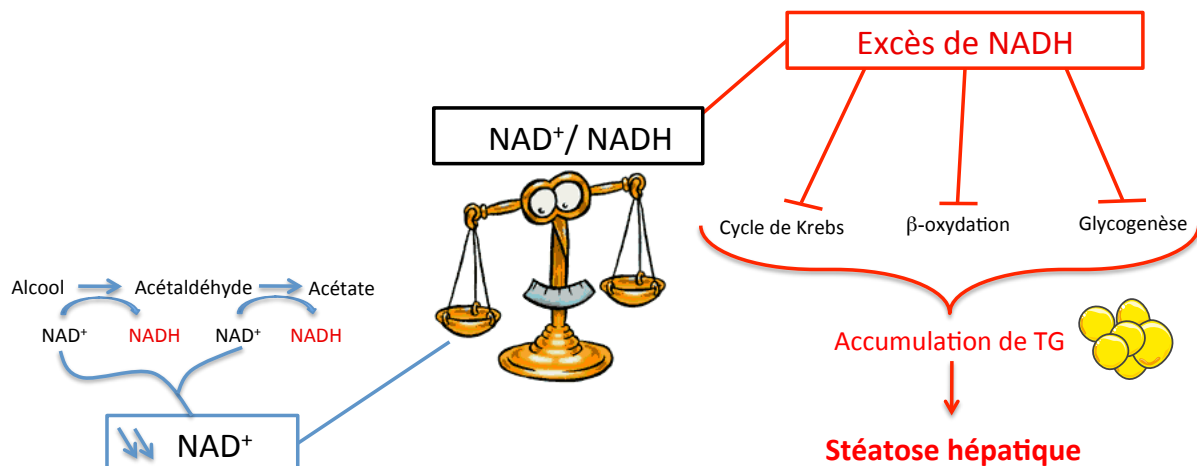
Dans la deuxième étape du métabolisme de l'alcool, l'acétaldéhyde est converti très rapidement en acétate grâce à l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH). Cette enzyme est retrouvée majoritairement dans la mitochondrie et plus faiblement dans le cytoplasme et les microsomes des hépatocytes. Il existe 19 isoformes de l'ALDH chez l'Homme (159). Ces isoformes peuvent présenter des activités différentes. La présence d'un variant de l'ALDH2 dans la population japonaise est associée à une intolérance à l'alcool. En effet, l'ALDH2 voit sa capacité à dégrader l'acétaldéhyde faible, voire nulle (160, 161). Ce manque d'activité de l'ALDH2 induit une accumulation d'acétaldéhyde dans le sang périphérique, connu sous le nom de « syndrome de flush » et est caractérisé par des rougeurs faciales, de la tachycardie, des nausées et des maux de tête.

L'acétate produit par ce métabolisme de l'alcool hépatique est distribué dans la circulation sanguine pour être oxydé par les tissus périphériques en dioxyde de carbone, en eau et en acides gras (157).

Les deux enzymes impliquées dans l'oxydation de l'alcool (ADH et ALDH) utilisent le  $\text{NAD}^+$  comme cofacteur, ce qui conduit à une réduction de proportions de  $\text{NAD}^+$  au profit de l'accumulation de NADH dans l'organisme. Cette diminution du ratio  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  entraîne

une inhibition du cycle de Krebs, de la glycogénèse et inhibe également la  $\beta$ -oxydation mitochondriale.

En effet, la  $\beta$ -oxydation mitochondriale utilise comme cofacteur du  $\text{NAD}^+$  qui a été fortement consommé par le métabolisme de l'alcool. La  $\beta$ -oxydation des AG est donc bloquée par manque de cofacteurs  $\text{NAD}^+$ . Par conséquent, sans dégradation des TG, ils s'accumulent dans le foie et participent à la stéatose (figure 41).



**Figure 41 : Déséquilibre du rapport  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  dans la MAF**

*Le rapport  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  est diminué dans la MAF et ce déséquilibre participe à la stéatose alcoolique. L'excès de  $\text{NADH}$  inhibe le cycle de Krebs, la  $\beta$ -oxydation et la glycogénèse, ce qui entraîne une accumulation des triglycérides (TG) dans le foie et conduit à la stéatose.*

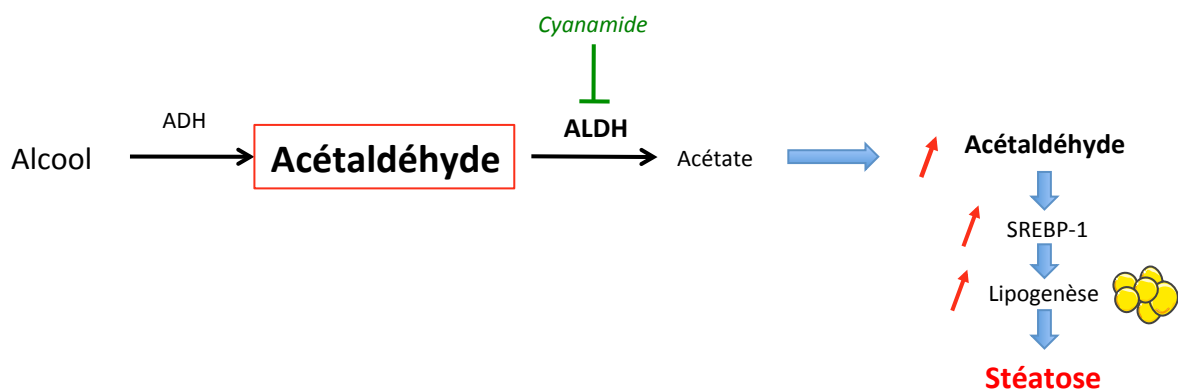
### **V.3.2. Impact de l'alcool sur les compositions membranaires**

L'éthanol provoque des changements physiques dans toutes les membranes biologiques y compris dans celles de la mitochondrie hépatique et du RE. La présence d'éthanol fluidifie directement les bicouches lipidiques membranaires, aussi bien chez le rat, la souris ou sur des cultures cellulaires. Il est à noter que lors d'une consommation chronique d'alcool, les membranes cellulaires peuvent résister aux effets de l'éthanol en adaptant leur contenu lipidique régulant ainsi la fluidité membranaire. En plus des changements dans la composition des membranes, l'alcool change la composition des protéines membranaires et peut les dénaturer. Ces changements causés par l'alcool participent à la production de ROS, à l'augmentation de la peroxydation lipidique, et favorise l'apoptose des hépatocytes (162).

### V.3.3. Changement dans l'équilibre d'oxydo-réduction hépatique

Comme nous avons pu le voir précédemment, la consommation excessive d'alcool entraîne une augmentation de son métabolisme associé à l'augmentation massive de NADH. Cette augmentation de NADH altère des régulateurs de la  $\beta$ -oxydation tels que SREBP-1 ou PPAR- $\alpha$ . En effet, la consommation d'alcool entraîne l'augmentation au niveau hépatique de l'activité de SREBP-1 et la diminution d'activité du récepteur PPAR- $\alpha$  favorisant l'accumulation des TG. Ces résultats obtenus *in vitro* ont été confirmés dans un modèle murin et montrent que le niveau de SREBP-1 hépatique est significativement plus élevé chez les souris exposées à l'éthanol (163, 164).

L'effet de l'éthanol sur SREBP-1 semble être médiée par le métabolisme de l'acétaldéhyde. En effet, dans des modèles *in vitro*, des expériences utilisant un inhibiteur de l'un des isoformes de l'ADLH, le cyanamide, montrent que l'accumulation d'acétaldéhyde augmente SREBP-1 et la stéatose (165) (figure 42).



**Figure 42 : Le métabolisme de l'alcool participe à la stéatose**

L'inhibition d'un ALDH entraîne une augmentation de l'acétaldéhyde qui favorise la stéatose. L'inhibiteur utilisé est écrit en vert et l'encadré rouge représente le composé augmenté.

La consommation excessive d'alcool chronique entraîne une induction du système MEOS, et aussi de l'expression de CYP2E1 (166). Or, le CYP2E1 peut inhiber l'activation de PPAR- $\alpha$ , régulateur positif de la  $\beta$ -oxydation, et ainsi contribuer au développement du foie stéatosique alcoolique (Lu 2008). Des études *in vivo* faites chez le rat ont montré une régulation négative de l'activité de PPAR- $\alpha$  au cours de la stéatose hépatique (167). Le traitement par des agonistes de PPAR- $\alpha$ , les fibrates, induit une diminution de la stéatose chez des rats alcoolisés. Des études similaires ont été faites chez des souris déficientes en PPAR- $\alpha$ , confirmant le rôle protecteur de PPAR- $\alpha$  dans la stéatose alcoolique (164).

Ces résultats relient le métabolisme de l'alcool à la dérégulation de l'homéostasie lipidique. Si les mécanismes ne sont pas totalement identiques, que ce soit dans la MAF ou la NAFLD, la dérégulation des ratios des coenzymes NADH reste un facteur commun majeur essentiel. Ces altérations des ratios de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  entraînent une activation accrue de la peroxydation lipidique caractérisée par l'augmentation du HNE et du MDA comme cela a déjà été décrit dans la NAFLD. L'augmentation de ces composés dans la MAF a été largement décrite avant même qu'elle soit identifiée dans la NAFLD (168).

#### **V.4. Perturbations immunitaires dans la MAF**

##### ***V.4.1. L'activation des cellules de Kupffer : actrice dans la progression de la MAF***

L'activation des cellules de Kupffer joue un rôle clé dans les étapes précoces de l'inflammation au cours de la MAF.

L'implication des KC dans la MAF est connue depuis plus longtemps que dans la NAFLD. De ce fait, un grand nombre de données mettant en évidence le rôle primordial de la KC dans la MAF, ont été obtenues en utilisant des animaux transgéniques sans techniques à haut débit, type TLDA (pour anglais *Taqman Low Density Array*). Inversement beaucoup de données récentes sur le rôle de la KC dans la NAFLD ont utilisées la cytométrie en flux, outil rapide et performant, dont l'utilisation quotidienne est finalement relativement récente et des techniques de biopuces. Les résultats récents générés par ces techniques ont fourni des informations que les études dans la MAF n'avaient pu générer. Les premières publications mettant en évidence une dysfonction des KC dans la MAF remontent à 1991.

Les auteurs observaient par microscopie électronique à transmission, une augmentation du nombre de macrophages hépatiques dans la région périportale de rats alcoolisés comparés à des rats non alcoolisés. De plus, en utilisant des techniques colorimétriques, basées sur les sels de tétrazolium, les auteurs pouvaient évaluer la capacité des macrophages hépatiques à produire des anions superoxydes *in situ*. Ils ont pu établir que ces macrophages étaient activés et produisaient plus de superoxydes en cas d'alcoolisation à long terme (169).

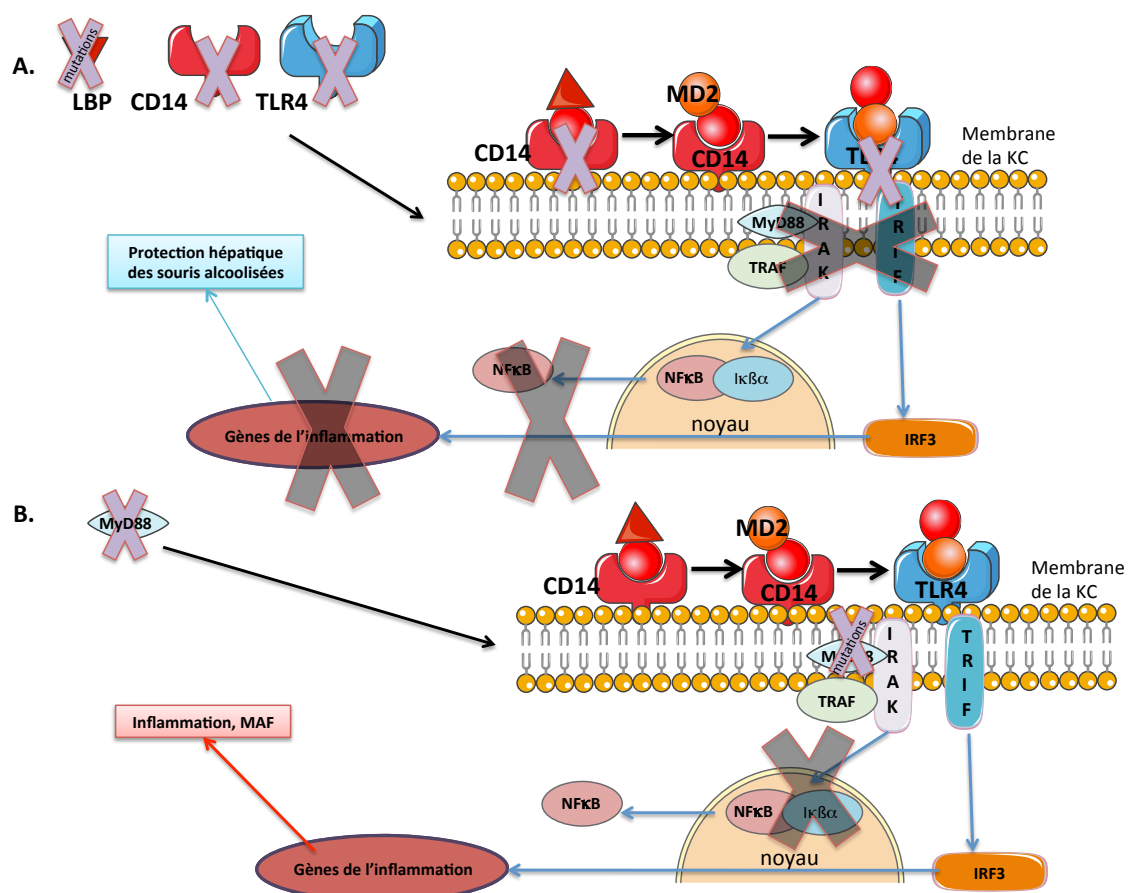
Les KC sont la principale source de TNF- $\alpha$  au niveau du foie. La déficience du TNFR1 (pour l'anglais *TNF receptor 1*), empêchent le TNF- $\alpha$  d'exercer ses effets, et les souris ne développent pas de lésions hépatiques après une alcoolisation (170). Par ailleurs, les patients ayant une hépatite alcoolique sévère présentent une sécrétion de TNF- $\alpha$  augmentée. Afin de confirmer la participation des KC aux lésions hépatiques causée par l'alcool, d'autres équipes ont utilisé des modèles animaux dans lesquels les KC étaient déplétées par intoxication au chlorure de gadolinium. Ces animaux ne développaient pas de lésions hépatiques induites par l'alcool (171). Ces résultats prouvent le rôle crucial du TNF- $\alpha$  en partie via la KC dans la genèse des lésions hépatiques au cours de la MAF.

L'activation de la cellule de Kupffer au cours de la MAF est également liée au stress oxydant et à la production de ROS (172). L'infection *in vitro* des KC, isolées de rat alcoolisés, avec un adénovirus contenant de la superoxyde dismutase entraînent l'élimination des ROS, la diminution de l'activation de NF $\kappa$ B et l'incapacité des KC à produire du TNF- $\alpha$  (173). Par ailleurs, le complexe NADPH oxydase, actif surtout dans les phagocytes activés donc la KC, est connu pour être une source majeure de ROS dans la MAF. Afin de prouver cette hypothèse, des souris avec une déficience totale d'une sous-unité de la NADPH oxydase ont été alcoolisées. Ces études ont montré une réduction de la production des ROS, de l'inflammation et une diminution des lésions hépatiques. De plus, en utilisant un inhibiteur de la NADPH oxydase chez des rats alcoolisés, des résultats identiques sont observés (174). Ces données sont cohérentes avec l'hypothèse qu'au cours de la MAF, la saturation de la NADPH oxydase dans les KC joue un rôle majeur dans la production de ROS. Cette voie de la NADPH oxydase des KC, est ainsi une de celle qui participe à l'inflammation en diminuant la capacité de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale par manque de cofacteurs, à l'instar de la réoxydation des coenzymes réduits NAD<sup>+</sup>/NADH dans les hépatocytes (figure 39, page 89) (175).

Il a été clairement établi que la perméabilité intestinale est augmentée suite à la consommation chronique d'alcool et corrélée à une augmentation significative des taux d'endotoxines (176, 177). Cette rupture de la barrière intestinale est associée à une augmentation d'expression de CD14 sur les KC (178, 179), et induit une activation de la signalisation médiée par le récepteur TLR 4 (chapitre IV, figure 34, p 73).



La littérature scientifique a établi l'importance de chaque acteur de la signalisation TLR 4 dans les lésions hépatiques au cours de la MAF en employant des souris transgéniques déficientes pour ces acteurs. Si l'on bloque la voie TLR 4 en utilisant des souris C3H/HeJ ayant un TLR 4 muté défectueux, celles-ci ne présentent plus de lésions hépatiques induites par l'alcoolisation chronique comparées aux souris non mutées (180). D'autres études utilisant des souris déficientes en CD14 (181) ou en LBP (182) ont permis de montrer leurs rôles dans la voie d'activation du TLR 4 au cours de la MAF. Des études se sont concentrées sur le rôle de Myd88, une des voies de signalisation activée par le TLR 4 dans les dommages hépatiques liés à l'alcool. Ils ont montré que la déficience en Myd88 ne prévient pas l'inflammation et les lésions hépatiques. Ainsi, la voie de signalisation du TLR 4, indispensable au développement des lésions dans la MAF, se fait indépendamment de la voie Myd88 (183). Ces résultats ont été retrouvés dans la NAFLD (figure 43).



**Figure 43 : Les différentes mutations des voies de la signalisation TLR 4**

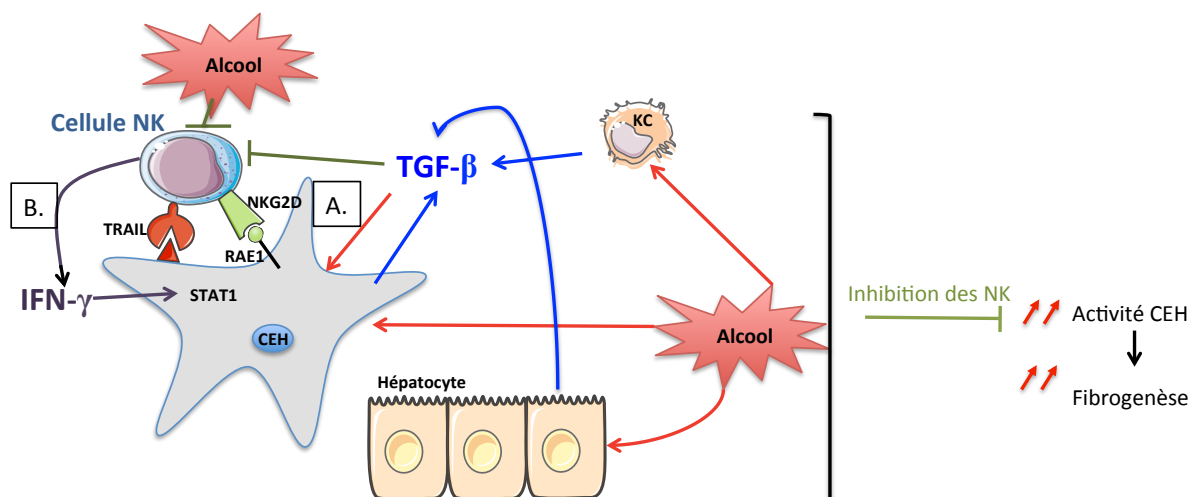
A. Les mutations de CD14, TLR 4 ou la LBP empêchent la signalisation médiée par l'activation du récepteur TLR 4, et donc les souris sont protégées de la MAF. B. La mutation de Myd88 n'empêche pas la signalisation de TLR 4 via TRIF, les souris développent des lésions hépatiques.

Les KC au cours de la MAF participent également à la fibrose. La surconsommation d'éthanol induit une augmentation de la production de TGF- $\alpha$  (184) et de TGF- $\beta$  par les hépatocytes mais également par les cellules de Kupffer (185). Or le TGF- $\alpha$  et le TGF- $\beta$  sont des régulateurs clés de l'activation et de la différenciation des CEH. L'activation de ces CEH entraîne une réponse fibrogénique qui aggravera les lésions hépatiques (186).

A travers ces mécanismes impliqués dans l'inflammation hépatique, il est clairement établi, de même que dans la NAFLD, que la KC est largement impliquée dans les mécanismes initiateurs de l'inflammation hépatique.

#### V.4.2. Altération des lymphocytes dans la MAF

Des dérégulations lymphocytaires ont également été mises en évidence au cours de la MAF, notamment au stade de fibrose. Des études démontrent une diminution du nombre des NK et de leur activité dans le foie lors d'une consommation chronique d'alcool (187, 188). Or les cellules NK ont une fonction anti-fibrotique importante dans un foie sain par plusieurs mécanismes (figure 44).



**Figure 44 : Modèle d'accélération de la fibrogenèse engendré par l'alcool**

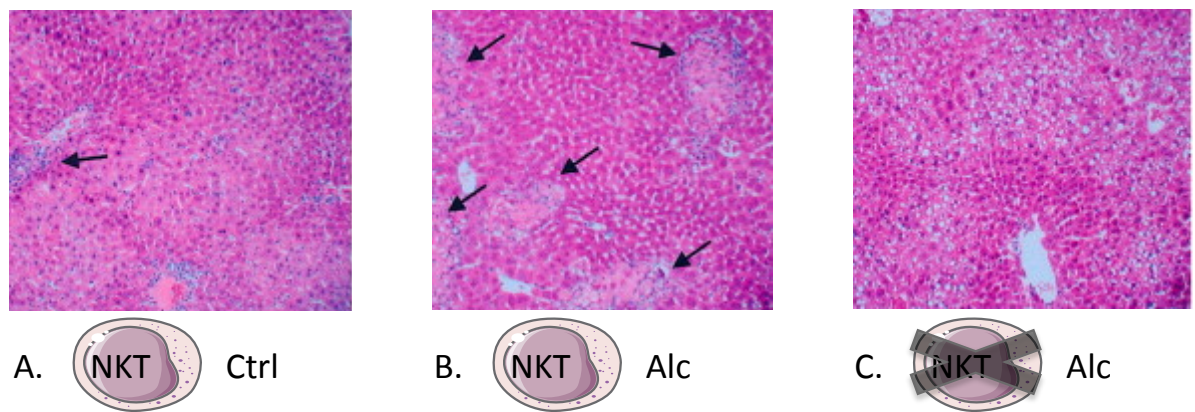
A. Les cellules NK reconnaissent les cellules étoilées hépatiques (CEH) activées comme des cellules modifiées car elles présentent un ligand activateur RAE-1 et une expression moindre de CMH-I qui est un ligand inhibiteur des NK. La mort des CEH se fait par un mécanisme apoptotique TRAIL dépendant. B. Les NK produisent de l'IFN- $\gamma$  qui arrête le cycle cellulaire des CEH via STAT-1. La consommation d'alcool permet l'inhibition des NK en favorisant la production de TGF- $\beta$  par les cellules de Kupffer (KC), les hépatocytes, et les CEH elles-mêmes. La diminution des NK au cours de la MAF ne peut donc plus modérer la fibrose induite par les CEH. Adapté de Jeong, 2008 (187).

Premièrement, les cellules NK impliquées dans l'immunité innée, reconnaissent les CEH activées comme des cellules modifiées car elles produisent un ligand activateur des cellules NK : RAE-1 (pour l'anglais *Retinol Acid Early inducible gene 1*), reconnu par NKG2D et de surcroît, les CEH activés présentent une expression moindre du CMH-I, un ligand inhibiteur des NK (189). La mort cellulaire des CEH se déroule selon un mécanisme de mort induite impliquant TRAIL (pour l'anglais *Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand*), une cytokine inductrice de l'apoptose dépendant de l'activation de NKG2D et de la caspase 3. L'activation du récepteur NKG2D (pour l'anglais *NK Group 2, member D*) rend les CEH sensibles à la lyse induite par les cellules NK (190, 191).

Deuxièmement, les cellules NK diminuent la fibrose hépatique via la production d'IFN- $\gamma$ , une cytokine qui induit l'arrêt du cycle cellulaire des CEH et une apoptose dépendante de STAT-1 (pour l'anglais *Signal Transducer and Activator of Transcription 1*) dépendante.

Au cours de la MAF, la diminution du nombre de NK ne pourra donc plus refreiner la fibrose via le contrôle des CEH. La diminution du nombre de NK est due à la réduction de l'expression des récepteurs activateurs des cellules NK comme TRAIL ou NKG2D dans le foie, la production d'IL-10 et de TGF- $\beta$  par les monocytes et les CEH activées elles-mêmes.

Le rôle des lymphocytes NKT dans la MAF a également été mis en évidence. En effet, dans un modèle murin d'alcoolisation, si on active les lymphocytes NKT via l' $\alpha$ -galactosylcéramide ( $\alpha$ -GC), on augmente le degré des lésions hépatiques (figure 45B). Des souris alcoolisées déficientes en CD1d (CD1d<sup>-/-</sup>) présentent une diminution des lymphocytes NKT et ne développent pas de lésions hépatiques (figure 45 C). Par conséquent, l'activation des cellules NKT par l' $\alpha$ -GC chez la souris alcoolisée conduit à des lésions hépatiques importantes (192).



**Figure 45 : Impact des lymphocytes NKT sur l'inflammation au cours de la MAF**

*Histologie de foies de souris nourries au régime contrôle (A) ou alcoolisées (B) et foie de souris  $CD1d^{-/-}$  ayant moins de NKT alcoolisées (C). L'alcoolisation entraîne une augmentation des infiltrats lymphocytaires (B). La diminution drastique des NKT chez des souris alcoolisées empêche l'apparition de ces infiltrats lymphocytaires (C). Adapté de Minagawa et al., 2004 (192).*

Des études récentes confirment l'importance des NKT dans la MAF. En utilisant des souris déficient en iNKT (pour l'anglais *invariant NKT*) par la délétion de leur TCR invariant  $V\alpha14-J\alpha18$ , les auteurs montrent que l'absence d'iNKT entraîne un retard de l'apparition des lésions hépatiques dues à l'alcool (193).

Comme nous venons de le voir, que ce soit dans les NAFLD ou dans la MAF, il existe une hétérogénéité à développer des hépatopathies métaboliques importante. De la même façon que dans la NAFLD, 20 % des consommateurs excessifs d'alcool vont progresser vers des formes aggravées de MAF telles que la cirrhose (194, 195).

Il existe donc d'autres facteurs que l'obésité ou la consommation d'alcool intervenant dans l'aggravation de ces pathologies. Parmi ces facteurs et compte tenu du rôle des antigènes bactériens dans l'activation immunitaire du foie, le rôle des bactéries commensales est depuis quelques années apparu comme essentiel. Je terminerai donc cette introduction par un chapitre sur le microbiote intestinal.



## Chapitre VI. Le microbiote intestinal

Le terme « microbiote » vient des racines grecques « micro » et « bios » qui signifient respectivement « petit » et « vie ». Ce terme est approprié car le microbiote regroupe l'ensemble des micro-organismes capables de vivre dans un environnement spécifique donné. Il existe de nombreux microbiotes qui peuplent le corps humain, notamment celui de la peau, de la cavité buccale, du vagin. Les bactéries de notre microbiote entretiennent des interactions directes et indirectes avec leur hôte qui leur sont mutuellement bénéfiques. Ce mutualisme entre l'hôte et ses bactéries commensales est même qualifié de symbiotique car les deux partenaires ont développé une association nécessaire et obligatoire pour leurs survies respectives.

Durant la décennie passée, le domaine de la recherche sur le microbiote a connu une évolution exceptionnelle. Le résultat est la publication d'une pléthore d'articles étudiant les populations bactériennes intestinales et leur impact sur l'organisme de l'hôte.

Je me concentrerai sur le microbiote intestinal (MI) dans ce chapitre et son rôle en tant que cofacteur dans les hépatopathies métaboliques.

### VI.1. Relation entre le foie et l'intestin

Le foie et le tractus gastro-intestinal sont intimement liés tant d'un point de vue métabolique qu'immunitaire, ceci résultant principalement de leur étroite relation anatomique et physiologique.

Les nutriments, ainsi que toutes les substances dérivées de l'intestin, sont délivrés au foie via la circulation portale (figure 1, chapitre I). Le ralentissement du flux sanguin dans les sinusoides du foie permet des interactions entre les substances dérivées de l'intestin, les hépatocytes et les cellules immunitaires hépatiques. Dans ce contexte, tout micro-organisme arrivant via la veine porte, qu'il soit pathogène ou commensal, peut être détecté par les cellules du foie. Comme vu précédemment, la cellule de Kupffer tient un rôle important dans l'immunité hépatique (chapitre II) et dans des contextes non pathologiques, elle participe à la protection du foie. Cette fonction protectrice des KC s'étend au drainage des bactéries arrivant via l'artère hépatique, c'est à dire la circulation systémique. En effet,

une étude récente a montré que lors de pathologies intestinales entraînant une rupture de la barrière intestinale, des bactéries entre autres commensales peuvent court-circuiter le système lymphatique (196). Ces bactéries vont ainsi parvenir au foie via l'artère hépatique indépendamment de la rate. Le foie, en particulier les KC, sont un pare-feu quotidien face aux bactéries du sang portal provenant du tube digestif mais également face aux bactéries du sang systémique dans des conditions pathologiques.

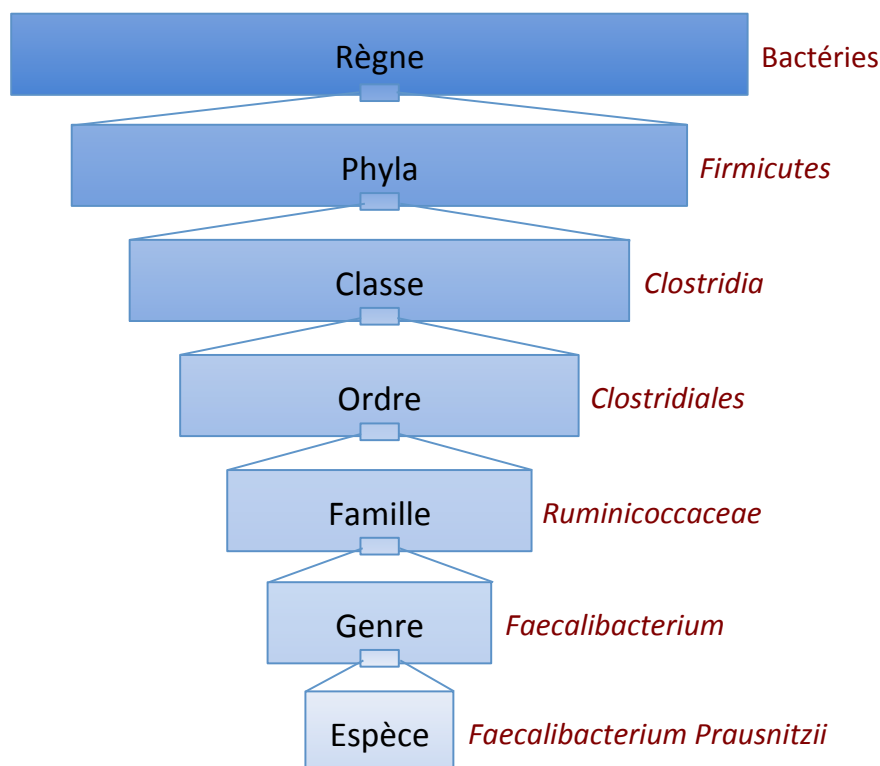
Dans ce contexte, des dommages hépatiques peuvent entraîner des altérations dans la capacité de clairance des bactéries du sang, qu'il soit portal ou systémique. Des bactéries commensales peuvent échapper au système et se retrouver dans le sang. L'étude réalisée par le groupe de Balmer a montré que la présence d'anticorps dirigés contre des espèces bactériennes commensales était un reflet de ces altérations. Dans les hépatopathies métaboliques, les patients présentant différents stades de la NAFLD, stéatose, NASH ou cirrhose présentaient tous des immunoglobulines (Ig) IgA et des IgG circulants dirigés contre des bactéries commensales, aérobies ou anaérobies. Ceci peut entraîner l'activation spontanée des réponses immunitaires et induire une réponse systémique contre ces bactéries commensales (196). Dans les hépatopathies humaines précédemment décrites (la NAFLD et la MAF) ainsi que dans les modèles murins associés, il a déjà été décrit une augmentation conséquente du passage des bactéries commensales à travers la barrière intestinale qui conduit à une réponse immunitaire augmentée et participe à la progression des pathologies (197).

Ces données renforcent donc au-delà de l'axe portal, l'importance de cette triade intestin/microbiote/foie et soulignent bien évidemment le rôle indéniable du MI dans les hépatopathies métaboliques.

## **VI.2. Le microbiote intestinal : un écosystème polyvalent**

Le MI se situe à l'interface entre notre environnement, notre alimentation et notre tube digestif. Ce MI est un écosystème bactérien d'une grande complexité d'une part via son interaction avec l'hôte et d'autre part par son activité métabolique. Le MI participe à différentes fonctions de l'organisme qui en fait un acteur incontournable de notre santé.

Le MI est composé principalement de bactéries, mais aussi d'archées, de virus et de levures (198). Nous détaillerons les données actuelles qui sont connues concernant les populations bactériennes. Ces bactéries peuplant le microbiote intestinal sont nombreuses et sont classées selon différents niveaux taxonomiques. Cette taxonomie est un système d'emboîtement qui peut être illustrée comme des poupées gigognes. Les bactéries représentent un règne, celui-ci est composé de phyla, l'embranchement taxonomique le plus élevé, eux-mêmes divisés en classes. Ces classes se divisent en ordres, eux mêmes répartis en familles. Enfin, les familles sont composées de genres bactériens qui se divisent en espèces. De cette façon, chaque espèce bactérienne peut être classée dans un genre, une famille, un ordre etc ... (figure 46).



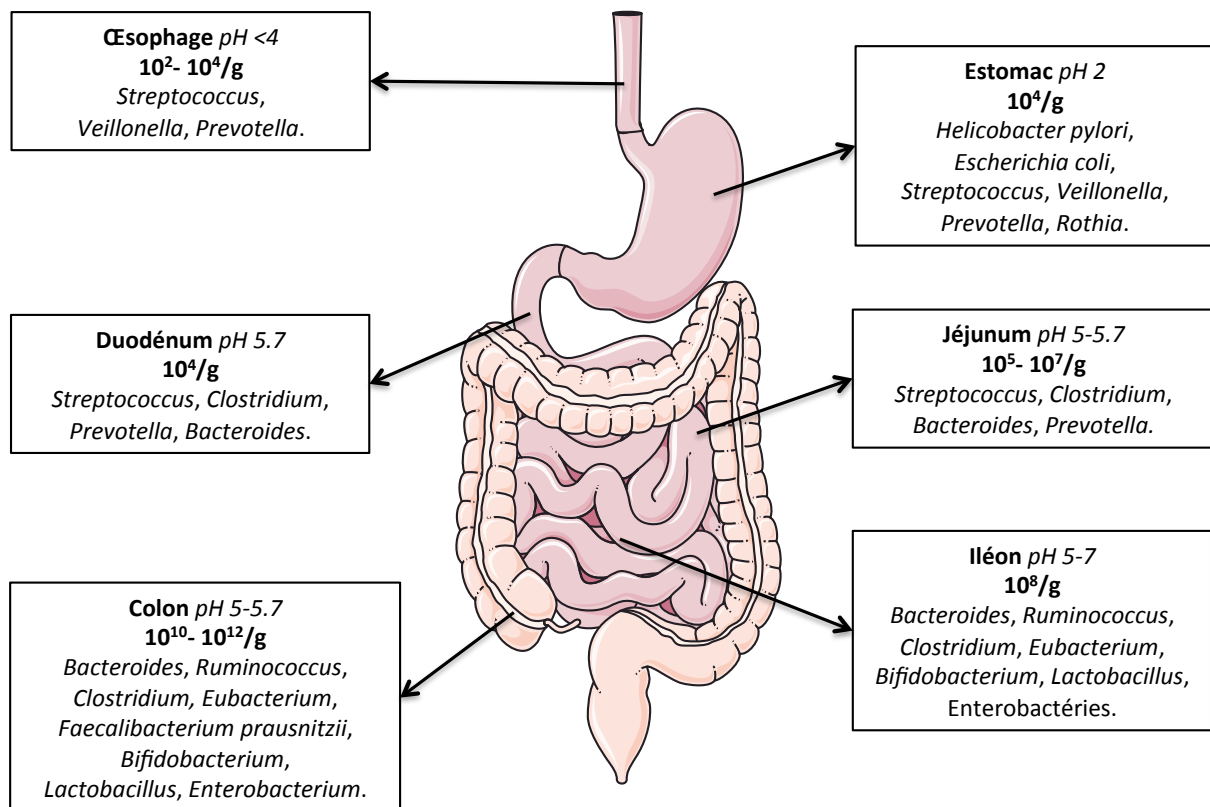
**Figure 46 : Classification du domaine des bactéries**

Les principaux rangs des taxons par ordre décroissant (en partant du haut vers le bas) du schéma sont : le règne, le phyla, la classe, l'ordre, la famille, le genre, et l'espèce avec un exemple à droite. Adapté de l'article taxonomie (wikipedia.fr).

Avec 10 à 100 trillions ( $10^{14}$ ) de bactéries, notre intestin représente le microbiote humain le plus peuplé (199, 200). Le microbiote intestinal représente dix fois plus de bactéries et cent fois plus de gènes que de cellules eucaryotes dans tout notre organisme. Ainsi, si l'on s'amuse à comparer ces proportions, l'Homme est majoritairement procaryote plutôt qu'eucaryote (201)!



La concentration bactérienne dans le TGI augmente suivant un gradient oro-anal. Ainsi, l'estomac présente une concentration bactérienne faible avec seulement  $10^4$  bactéries/g de contenu, alors que l'intestin grêle en comptabilise nettement plus avec  $10^4$  à  $10^8$  bactéries/g. La densité bactérienne est maximale dans le côlon avec  $10^{10}$  à  $10^{12}$  bactéries/g (202) (figure 47).



**Figure 47 : Schéma de la répartition du MI dans le TGI**

Pour chaque partie du TGI, la concentration (en g/contenu) et les genres bactériens les plus représentés sont indiqués ainsi que l'acidité locale. Adapté de Coudeyras et al., 2010.

De plus, la répartition bactérienne dans le TGI n'est pas homogène car elle s'effectue selon les différentes contraintes de son environnement. La concentration bactérienne croissante est expliquée par les évolutions inverses de l'acidité intestinale et de la quantité d'oxygène présente. Ainsi, dans l'estomac qui présente un pH acide (pH = 2-3) et une teneur en oxygène plus élevée que dans les autres parties du TGI, la colonisation par des bactéries aérobies telles que des *Escherichia coli* ou des aéro-anaérobies facultatives comme *Helicobacter pylori* est possible (202). Cependant, la progression vers l'intestin distal où la quantité en oxygène diminue et le pH augmente, va inversement favoriser la croissance des bactéries anaérobies facultatives et strictes.

Du fait des conditions particulières de vie des bactéries et en particulier les aéro-anaérobies strictes, une majorité de nos bactéries intestinales est peu étudiable par des méthodes de cultures classiques (203). L'avènement de la biologie moléculaire et des techniques de séquençage à haut débit ont permis ces dernières années une avancée considérable dans l'identification des espèces bactériennes colonisant notre tube digestif et la compréhension de leurs fonctions dans l'organisme. Par ailleurs, la compréhension du rôle du MI a largement été améliorée par l'utilisation de souris axéniques, nées stérilement et élevées en conditions de stérilité totale dans un isolateur (figure 48). Les déficiences observées chez ces souris ont permis de clarifier différentes fonctions assurées par le MI.



**Figure 48 : Photo d'un isolateur pour rongeur axénique**

*Les souris axéniques vivent en confinement absolu qui les protège de tous les germes.*

### **VI.3. Fonction du MI**

Les bactéries de notre MI se nourrissent de nos cellules mortes, des résidus des aliments que nous consommons et de nos muqueuses. En échange, elles participent au bon fonctionnement de notre organisme en assurant différentes fonctions (figure 49) (204). Ces fonctions sont aussi variées que :

- Le métabolisme des substrats glucidiques et lipidiques (notamment celui du cholestérol via son action dans le cycle entéro-hépatique)
- La synthèse de vitamines essentielles
- La maturation, le développement et l'homéostasie immunitaire.

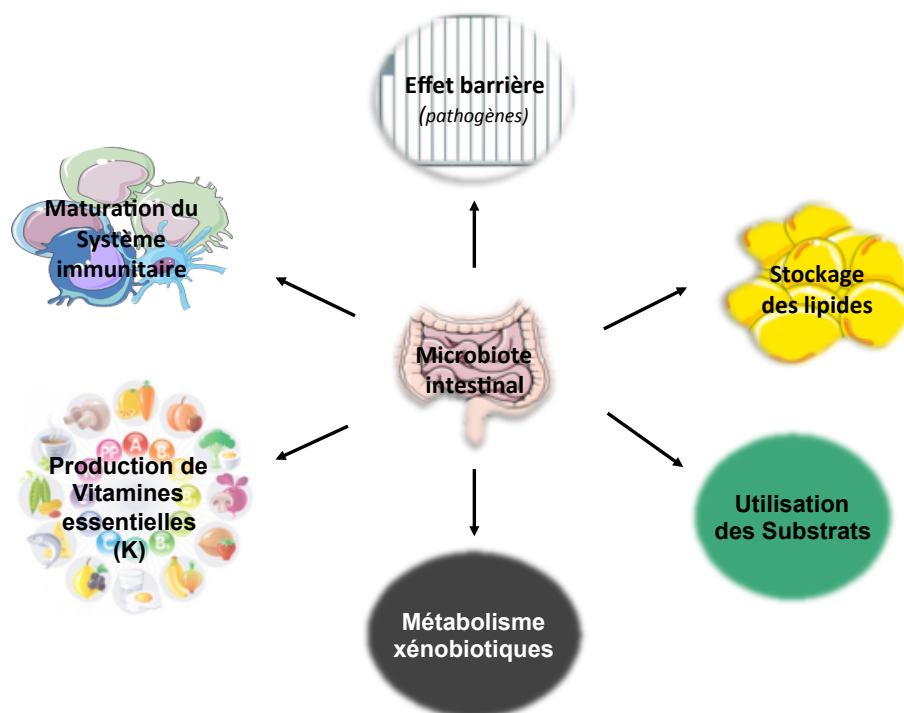


Figure 49 : Les différentes fonctions du microbiote intestinal

### *VI.3.1. Le MI et ses fonctions métaboliques*

Le MI participe à la digestion des aliments, notamment au métabolisme des glucides et des lipides. En effet, les bactéries du MI produisent des enzymes digestives (lactases) et participent à la fermentation des nutriments et fibres non digérées. Dans la suite de cette partie, je vais détailler les populations bactériennes intervenant dans ces processus.

L'intestin reçoit tous les jours environ 5 à 8 g de lipides. Ces lipides peuvent être des lipides bactériens, des lipides provenant de la desquamation des colonocytes ou de l'alimentation. Ces lipides parvenant dans le côlon subissent de multiples transformations effectuées par les bactéries du microbiote intestinal (hydrolyse, oxydation, réduction, hydroxylation...). Pour effectuer ces transformations, les espèces bactériennes possèdent des fonctions de lipases qui peuvent hydrolyser les AGCL (205).

Les produits de ces transformations par les bactéries sont ensuite métabolisés en produits terminaux de fermentations. Ces produits de fermentation sont des AGCC comme l'acétate, le propionate, ou le butyrate.

L'acétate est synthétisée par la majorité des espèces prédominantes du côlon, comme les *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium* ou *Fusobacterium*. Le propionate est principalement synthétisé par les espèces du genre dominant des *Bacteroides*, des *Propionibacterium* ainsi que par celui des *Veillonella*. Le butyrate, quant à lui, est synthétisé par les bactéries du genre *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* et *Butyrivibrio* (206).

Le MI produit aussi des métabolites intermédiaires notamment le lactate. Dans le côlon humain, les bactéries lactiques, productrices de lactate, appartiennent principalement aux genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* ainsi qu'aux genres *Enterococcus*. Ces métabolites intermédiaires sont ensuite transformés en AGCC par les populations bactériennes précédemment citées.

Les AGCC sont rapidement absorbés au niveau de l'épithélium intestinal et sont métabolisés dans différents organes (épithélium colique, foie, muscle, cœur...) (202).

Le colon reçoit également du cholestérol dont 70 % provient de la bile, 20 % des aliments non absorbés au niveau de l'intestin grêle et les 10 % restants de la desquamation des muqueuses intestinales (207). Le MI est capable de métaboliser le cholestérol reçu en coprostanol, qui est non absorbé par l'intestin et éliminé dans les fèces. Ce métabolisme du cholestérol chez les individus se fait selon la composition du MI. En effet, elle est liée au nombre de bactéries réductrices de cholestérol présentes dans le tube digestif :  $10^6$ /g de contenu digestif est nécessaire pour une conversion partielle du cholestérol, tandis qu'une conversion totale nécessite une population supérieure ou égale à  $10^8$ /g (208). Même si ce métabolisme a été décrit depuis plusieurs années, les bactéries impliquées sont mal connues.

Le MI participe aussi au métabolisme du cholestérol via le cycle entéro-hépatique des acides biliaires. Pendant la circulation entéro-hépatique, la majorité des acides biliaires (95 %), arrivent au niveau de l'intestin grêle et rencontrent les bactéries du MI, qui peuvent les métaboliser (209, 210) (chapitre I, figure 5, page 24). Ces transformations sont nombreuses, et on retrouve notamment la déconjugaison, l'oxydation ou encore la 7-déshydroxylation. Chacune de ces transformations est médiée par une population bactérienne. Par exemple, la 7-déshydroxylation qui s'occupe de la dégradation du cholestérol en AB primaires et secondaires est catalysée par la 7- $\alpha$ -hydroxylase. Cette hydrolase appartient à des espèces appartenant aux genres *Clostridium* chez l'Homme.

L'implication du MI dans le métabolisme des glucides et des lipides a été également démontrée par l'utilisation de souris axéniques comparées à des souris ayant un MI. Ces études ont montré que les souris axéniques étaient plus minces et avaient une quantité de tissu adipeux réduite comparée aux souris conventionnelles (199). Ces résultats montrent que le MI contribue à l'absorption par l'hôte de glucides et de lipides et régule le stockage des graisses (211). La colonisation de ces souris axéniques par un MI aboutit à une augmentation de leur poids malgré une réduction de la prise alimentaire. Le MI est donc capable d'augmenter l'absorption de glucides et est donc un partenaire important dans les changements des métabolismes lipidique et glucidique rencontrés dans l'obésité. Dans ce contexte, le rôle du MI a été très étudié dans le cas de l'obésité (partie 2 de ce chapitre).

Ainsi le MI est capable d'interagir avec tous les composés qu'il rencontre aussi bien bactériens que glucidiques et lipidiques. Il est à noter que le MI participe aussi au métabolisme des xénobiotiques, notamment en hydrolysant des composés toxiques (204).

### ***VI.3.2. La synthèse de vitamines essentielles***

Les bactéries de la flore participent à la synthèse des vitamines qui constitue un apport complémentaire et suffisant par rapport à l'alimentation. Le MI est impliqué dans la synthèse des vitamines K, cobalamine (B12), acide folique (B9), pyridoxine (B6), biotine (B8), riboflavine (B2) ainsi que d'acides aminés essentiels (la méthionine, la cystéine) (212).

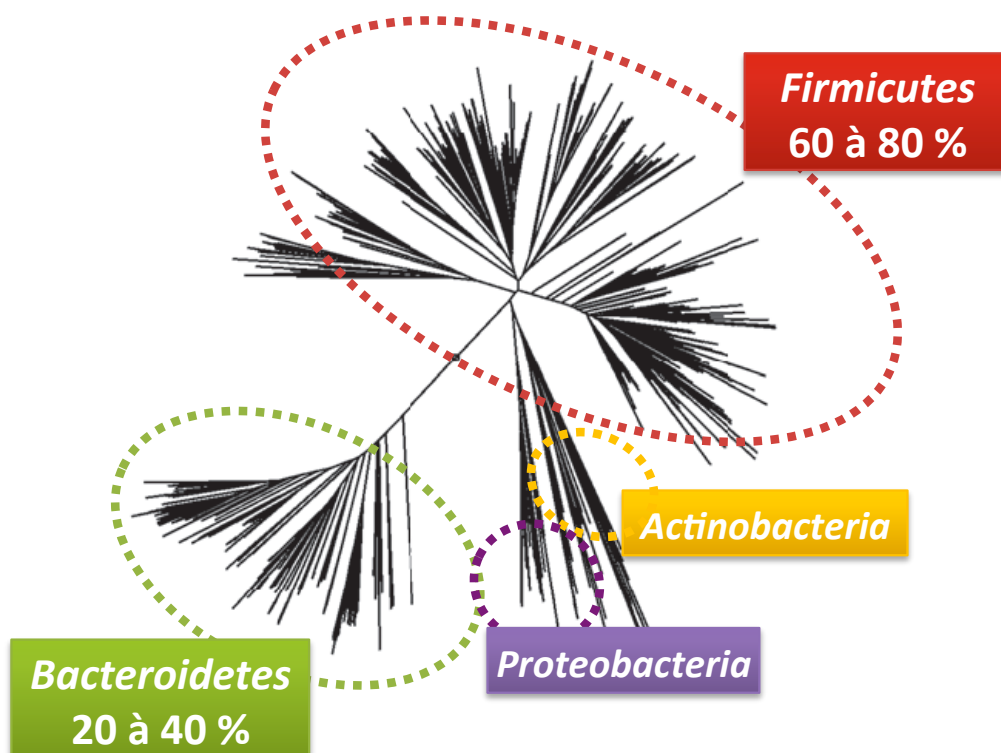
### ***VI.3.3. Le MI et les défenses immunitaires***

Les bactéries jouent un rôle de barrière contre les bactéries exogènes potentiellement pathogènes et s'opposent à leur colonisation dans l'intestin. En effet, en occupant la niche intestinale elles freinent la prolifération de ces bactéries exogènes. De plus, cette colonisation bactérienne est essentielle dans la maturation du système immunitaire. Les études réalisées avec l'utilisation des modèles axéniques ont permis de démontrer le rôle crucial du MI dans l'initiation, le développement et la maturation du système immunitaire (213, 214). En effet, ces animaux présentent de nombreuses anomalies physiologiques avec notamment un système immunitaire défaillant aussi bien au niveau intestinal que dans les autres organes comme la rate ou les ganglions.

L'inoculation d'un MI chez ces souris axéniques permet de restaurer une immunité fonctionnelle. En stimulant continuellement le système immunitaire, le MI participe à son développement, sa maturation, mais également au maintien de l'homéostasie intestinale, de la fonction de barrière de l'épithélium ou encore de l'équilibre entre réponses pro et anti-inflammatoires.

#### VI.4. Les espèces bactériennes du MI

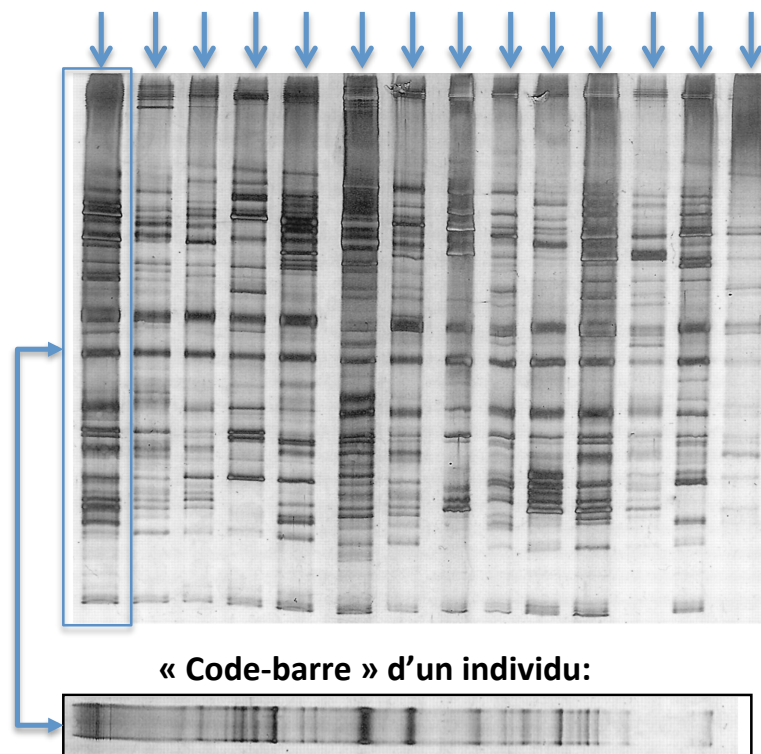
Le MI de l'Homme se compose de 2 phylas majoritaires, les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* qui représentent à eux seuls plus de 80 % du MI. On trouve également d'autres phyla en proportion beaucoup plus minoritaire, tels que les *Actinobacteria* et *Proteobacteria* (215) (figure 50).



**Figure 50 : Principaux phyla bactériens**

Arbre phylogénétique représentant les groupes dominants du microbiote intestinal. Adapté de Tal et al., 2009 (215).

Au niveau des phyla, la composition est relativement similaire d'un individu à l'autre, mais plus on descend dans les niveaux taxonomiques, plus on s'aperçoit que chaque individu possède un microbiote qui lui est propre (216). Ces données ne sont d'ailleurs pas récentes puisque les analyses précédemment réalisées par TTGE (pour l'anglais *Temporal temperature gradient gel electrophoresis*) montraient des profils bactériens spécifiques à chaque individu comparés alors à un code barre (217) (figure 51).



**Figure 51 : Code-barre bactérien spécifique de chaque individu**

TTGE (pour l'anglais *Temporal temperature gradient gel electrophoresis*) des produits de PCR de régions V6 à V8 provenant d'individus différents. Chaque flèche bleue indique le profil d'un individu.

Chaque individu héberge une composition bactérienne dans son microbiote qui lui est propre. Cette carte d'identité bactérienne est séparée, à l'instar des groupes sanguins, en trois entérotypes. Chaque entérotype est caractérisée par un genre bactérien dominant. Les *Bacteroides* prédominent dans l'entérotype 1, les *Prevotella* dans l'entérotype 2 et les *Ruminococcus* dans l'entérotype 3 (218). Il est à noter que contrairement aux groupes sanguins, les entérotypes peuvent évoluer tout au long de la vie et certains facteurs peuvent les déséquilibrer. Cette notion d'entérotypes décrite par Arumugam en 2011 reste toutefois contestée mais a l'avantage de permettre une classification qui sans nul doute va évoluer avec l'amélioration de nos connaissances sur le MI.

## **VI.5. Dysbiose du microbiote intestinal**

La dysbiose intestinale est un déséquilibre du microbiote qui va avoir des effets néfastes sur la santé de l'hôte. Cette dysbiose intestinale va être caractérisée par la diminution des bactéries protectrices au profit de l'augmentation de bactéries délétères.

A l'heure actuelle, un certain nombre de pathologies ont été identifiées comme étant associées à une dysbiose en particulier les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), comme la maladie de Crohn.

La maladie de Crohn est associée à une réduction quantitative et qualitative des *Firmicutes*, et notamment d'une espèce bactérienne dénommée *Faecalibacterium prausnitzii*. Cette bactérie joue un rôle anti-inflammatoire important et sa diminution chez les patients atteints de la maladie de Crohn est associée à une augmentation du risque de récurrence (219).

Le MI est étudié dans un grand nombre de pathologies aussi variées que les maladies cardiovasculaires (220), l'athérosclérose (221, 222), les addictions (223) ou les troubles psychiatriques dont l'autisme (224). Si des associations entre pathologies et dysbiose du MI sont fréquemment trouvées, le rôle du MI en tant que cofacteur dans ces pathologies n'est pas toujours établi.

Le rôle du MI dans les hépatopathies métaboliques a bien évidemment été abordé compte tenu de l'axe intestin/foie. Un certain nombre de données vont être présentées ci-dessous mais pour certaines, elles seront plus commentées dans la discussion des articles.

### **VI.5.1. Dysbiose liée à la NAFLD**

Comme nous l'avons vu précédemment, le MI participe à la régulation des métabolismes glucidique et lipidique. Or ces métabolismes sont fortement dérégulés au cours de l'obésité et participent à la pathogenèse de la NAFLD (225, 226).



Les premières études reliant la composition du MI à l'obésité ont été réalisées dans un modèle murin soumis à un régime riche en lipides. En effet, les souris soumises au régime présentaient une chute de la diversité du microbiote notamment corrélée à l'augmentation de la population des *Firmicutes* et la diminution des *Bacteroidetes* (227). Le séquençage du MI d'obèses (Homme et rongeurs) a permis de mettre en évidence des modifications des proportions de ces deux phylas majeurs (228). Une normalisation du poids, suite à une diète hypocalorique chez des patients obèses permet de restaurer le ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* similaire à celui observé chez des patients normo-pondérés (229).

Des études chez l'Homme ont établi des variations dans les classes des *γ-Proteobacteria* et *Erysipelotrichi* des patients ayant un régime déficient en choline. La présence des *γ-Proteobacteria* a été associée à un risque plus élevé de développer un foie stéatosique en fonction de la quantité de choline dans le régime (230).

D'autres populations du MI sont également altérées au cours l'obésité. Par exemple, des études récentes faites sur un modèle murin de souris obèses ont montré que les populations des *Akkermansia* sont diminuées dans le MI des souris obèses (231, 232). Par ailleurs, la diminution croissante des *Lactobacillus* est corrélée avec la sévérité de la stéatose (233, 234).

Plus récemment, des dysbioses ont été associées spécifiquement à la NAFLD. Ainsi chez des patients ayant une NASH, une augmentation des *Clostridium coccoides* a été observée par rapport à des sujets sains ou n'ayant qu'une stéatose isolée (235). Des adolescents atteints de NAFLD ou de NASH présentent des proportions plus faibles de *Firmicutes* de la famille des *Ruminococcaceae*, que des patients sains. De plus, ce MI dans la NASH est associé à une augmentation de la production endogène d'alcool. Les adolescents obèses ayant une NASH présentaient une augmentation significative d'*Enterobacteria* et en particulier d'*Escherichia coli* suggérant que ces bactéries pourraient être responsables de la production d'alcool. L'alcool produit par le MI participerait aux lésions hépatiques dans la NAFLD (236).

Ces observations témoignent de la présence de corrélations entre un phénotype hépatique et une dysbiose mais ne permettent pas d'établir de relation causale. Ce possible rôle causal du MI dans le développement de l'obésité a été abordé récemment (227, 237).

L'inégalité observée chez l'Homme face à la susceptibilité de la NAFLD est également présente dans les modèles murins. Effectivement, malgré un fond génétique équivalent, un groupe de souris soumis à un régime hyperlipidique, se composera de souris qui développeront une NAFLD et d'autres qui n'en développeront pas et ceci indépendamment de leurs prise de poids (237).

Afin de démontrer la causalité du MI face à cette disparité, Leroy et al. ont soumis des souris à un régime hypercalorique. Deux souris ont été sélectionnées, une souris ayant développé une inflammation systémique, une insulino-résistance et une stéatose (définie comme souris répondeuse), et une souris n'ayant pas développé ces désordres métaboliques (définie comme souris non répondeuse). Deux groupes de souris axéniques indépendants ont été inoculés séparément avec le MI de ces deux souris et ont été soumis à leur tour à un régime hypercalorique. Seules les souris ayant reçu le MI de la souris répondeuse ont développé une insulino-résistance et une stéatose, montrant le rôle causal du MI dans la genèse de la NAFLD.

Les pourcentages de *Bacteroides* ne divergeaient pas entre les deux types de MI. Toutefois, l'espèce *Bacteroides vulgatus* était surreprésentée dans le microbiote des souris ne développant pas de stéatose suggérant un rôle protecteur possible de cette bactérie. Inversement, une espèce de *Lachnospiraceae* et *Barnesiella intestinihominis* étaient plus abondantes chez les souris développant des complications hépatiques (237). Ces résultats démontrent que le MI d'un individu contenant des bactéries spécifiques détermine le développement de la NAFLD en réponse à un régime hypercalorique.

L'ensemble des données actuelles tend à prouver que le MI va être un cofacteur dans la progression des lésions hépatiques au cours de la NAFLD. Cependant, la grande complexité de cet écosystème ne permet pas encore à l'heure actuelle de dégager des espèces bactériennes spécifiquement impliquées dans les effets protecteurs ou inversement délétères.

### VI.5.2. Dysbiose liée à la MAF

L'identification du MI comme un des facteurs pouvant influencer le développement de la MAF est récente. Toutefois, d'anciennes études avaient déjà montré que l'utilisation d'antibiotiques qui ciblent les bactéries du TGI, protégeait les rats des lésions hépatiques causées par l'alcool (238).

L'altération de la barrière intestinale lors de la consommation d'alcool est établie depuis plusieurs années. Une augmentation de la concentration d'alcool sanguin est en effet associée à une moindre expression des protéines impliquées dans les jonctions serrées intestinales (239). De nombreuses études ont ainsi montré qu'une consommation chronique d'alcool augmentait la concentration de LPS portal et systémique, participant au développement de la MAF (240). De plus, les produits de l'inflammation associée à la MAF peuvent aussi participer à la rupture de la barrière intestinale (194, 241). Ainsi, des niveaux élevés d'endotoxines sont observés dans le sérum de patients alcooliques (242, 243) et les animaux soumis à un régime alcool (244). Dans les modèles animaux, une corrélation significative existe entre les niveaux d'endotoxines et la sévérité de l'atteinte hépatique induite par l'alcool (176).

Dans la consommation excessive d'alcool, les bactéries commensales peuvent également intervenir dans le métabolisme de l'alcool et de son dérivé métabolique, l'acétaldéhyde (155). Or ces deux composés participent à la rupture de la barrière intestinale qui va participer à la survenue de la MAF (245).

Le MI pourrait donc jouer un double rôle dans le développement de la MAF, d'une part en participant à l'augmentation de la perméabilité intestinale via la production d'acétaldéhyde, et d'autre part comme source de LPS ou d'autres composants bactériens capables d'induire une inflammation hépatique.

Dans des modèles de rongeurs alcoolisés, une dysbiose a été mise en évidence démontrant un effet de l'alcool sur la composition du MI (246, 247). On observe ainsi chez des rats alcoolisés, une diminution de la proportion de bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Lactococcus* (248, 249).

Ces modifications du MI sont associées à une augmentation de la translocation bactérienne et à une réduction de l'expression intestinale des peptides antimicrobiens de type lectines RegIII- $\beta$  et RegIII- $\gamma$ . Une autre étude a montré que l'administration d'alcool à des souris augmentait les proportions de *Proteobacteria* et d'*Actinobacteria*, tandis que celles de *Bacteroidetes* et de *Firmicutes* étaient diminuées. Ces modifications de la proportion des phyla constituant le MI s'accompagnaient d'une réduction de la diversité bactérienne (247).

Les résultats chez l'Homme sont similaires, avec une diminution des *Bacteroidetes* et une augmentation des *Actinobacteria* et des *Proteobacteria* (248). Plus récemment, il a néanmoins été montré que tous les patients alcooliques n'avaient pas les mêmes modifications du MI.

L'alcool et les produits microbiens générés ainsi que les changements dans le MI et l'augmentation de la translocation bactérienne pourraient en synergie promouvoir la progression de la MAF.

Ces différentes dysbioses entraînées par l'obésité et l'alcool peuvent participer à la pathogenèse de la NAFLD et de la MAF respectivement.



## **PROJET DE THESE**



Les mécanismes responsables de l'évolution de la stéatose vers des formes plus sévères de la NAFLD et de la MAF sont donc complexes et ne sont pas encore tous connus. Par ailleurs, chez les patients obèses ou consommateurs d'alcool, l'hétérogénéité de l'évolution des lésions prouve qu'il existe d'autres cofacteurs que l'obésité ou l'abus d'alcool participant à l'évolution vers les formes graves. En d'autres termes, l'alcool ou la surcharge alimentaire ne peuvent expliquer à eux seuls le développement de la NAFLD ou de la MAF.

Mon travail de thèse a consisté à clarifier ces différents points. En effet, j'ai tout d'abord focalisé mon étude sur le rôle de la cellule de Kupffer au cours de la NAFLD puis j'ai ensuite étudié le rôle d'un cofacteur dans la maladie alcoolique du foie, le microbiote intestinal.

J'ai étudié le rôle de la cellule de Kupffer dans l'installation des lésions hépatiques dans un modèle murin d'obésité induite par un régime hypercalorique. Ces travaux auxquels j'ai participé sont présentés dans l'article 1 de ce manuscrit (J. Hepatol), dans lequel je suis deuxième auteur. Je me suis concentrée ensuite sur l'impact du fructose au cours de la NAFLD. En effet, les modifications alimentaires actuelles ont largement augmenté la consommation de fructose. Au moment où ce travail a été commencé, quelques données apparaissaient sur le rôle potentiellement délétère d'un excès de fructose pour le foie. Dans ce contexte, j'ai comparé l'impact de régimes gras enrichis ou non avec du fructose. Ces travaux sont présentés dans l'article 2, article dans lequel je suis premier auteur. Dans cet article, j'ai abordé le rôle du microbiote intestinal dans la NAFLD.

Par ailleurs, j'ai apporté mon aide sur un projet parallèle développé dans le laboratoire et qui consistait à étudier l'impact d'une protéine de la tolérance immunitaire (GILZ) dans la cellule de Kupffer. Je suis co-auteur de cet article présenté dans l'annexe 2 (reviewing dans J. Hepatol).

Parallèlement à cela, notre équipe développait des projets et obtenait des résultats très intéressants sur le rôle causal du microbiote intestinal dans la maladie alcoolique du foie, MAF. J'ai pu participer à ces travaux en apportant mon aide sur quelques expériences pour lesquelles je suis co-auteur de 2 articles présentés, l'un en annexe 1 (Gut 2015) et l'autre en annexe 3 (en préparation). J'ai donc ensuite naturellement poursuivi ce travail sur la MAF.



Celui-ci a constitué à prouver que tout comme chez l'Homme, il existe une hétérogénéité à développer des lésions hépatiques après alcoolisation dans un modèle murin et je me suis intéressée au rôle du microbiote intestinal dans cette disparité. Je suis co-premier auteur sur ce travail qui sera soumis très prochainement. L'ensemble de ces résultats est présenté et discuté dans la suite de ce manuscrit ainsi que les articles dans lesquels je suis auteur.

## RESULTATS



## **I. La cellule de Kupffer, une actrice dans le développement de la NAFLD**



## I.1. Introduction

Avec l'incidence croissante de l'obésité, la NAFLD devient la cause la plus fréquente des maladies chroniques du foie dans les pays occidentaux. Une grande majorité des patients obèses développent une stéatose mais seulement 20 % de ces patients obèses évoluent vers une stéatohépatite (NASH). L'étude des mécanismes permettant de progresser vers la NASH est donc très importante afin de développer des stratégies permettant de les contrôler. L'inflammation lors de la NASH est associée à des dérégulations immunitaires hépatiques. Le recrutement de cellules inflammatoires dans le foie et leur activation sont des étapes de la progression de la stéatose vers la NASH. Lorsque ce travail a été initié, le rôle des macrophages tissulaires dans les états inflammatoires n'était pas totalement établi. Notre but était de prouver que lors de la stéatose, la cellule de Kupffer est altérée et participe à l'inflammation hépatique et à l'évolution de la stéatose vers la NASH.

J'ai ainsi étudié le rôle du macrophage hépatique dans les étapes précoces du déclenchement de la stéatohépatite. Ces expériences ont été réalisées en déclenchant une stéatose chez des souris soumises à un régime hyperlipidique. Les KC isolées de foies stéatosiques présentaient un volume plus important que celles issues de foies sains. L'observation de la morphologie des KC isolées de foies stéatosiques montrait une augmentation des gouttelettes lipidiques dans leur cytoplasme comparée à leurs homologues isolées de foies issus de souris non obèses. Il est à noter que ces KC que l'on qualifiait de « foamy » KC, en référence à ce qui était décrit par Wouters et al. (250) ont finalement été nommées « fat-laden » KC sur les recommandations d'un reviewer de notre article.

La première hypothèse qui avait été faite était que la stéatose était associée à une augmentation du nombre de KC dans le foie. De manière intéressante dans notre modèle murin d'obésité et également dans le foie de souris *ob/ob*, nous n'observions pas de différences de quantités de KC à ce stade de la pathologie. Cette observation nous a conduit à une deuxième hypothèse : si le nombre de KC n'est pas différent, la présence de ces gouttelettes lipidiques dans la KC peut-elle impacter leurs fonctions. Ces lipides pourraient participer à l'activation des macrophages, de la même manière que les lipides circulants captés par les monocytes favorisent l'initiation de la plaque d'athérome.

En mesurant la production de cytokines et de chimiokines, nous avons montré que les KC issues de foies stéatosiques sécrétaient plus de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires en condition basale. De plus, ces KC sont plus sensibles au LPS que les KC issues de souris contrôles. Dans nos études effectuées *in vitro* et *in vivo*, les fat-laden KC recrutent d'avantage les différentes populations lymphocytaires comparées aux KC de souris contrôles. Ainsi, l'accumulation de lipides dans la KC au cours de la stéatose engendre un phénotype pro-inflammatoire M1 qui participe au recrutement lymphocytaire.

Nous avons analysé la nature des lipides accumulés dans ces fat-laden KC. Les études de lipidomique ont été réalisées par spectrométrie de masse. Les diacylglycérols, qui sont des lipides toxiques, sont considérablement augmentés dans les KC issues de foies stéatosiques. Une augmentation significative des céramides et du cholestérol est également observée dans les KC de souris obèses et les niveaux relatifs des espèces ont été entièrement redistribués. Par ailleurs, l'expression de gènes de nombreuses enzymes impliquées dans la synthèse des lipides, leur stockage et leur transport est dérégulée. Ces données étaient donc en faveur d'une profonde dérégulation de l'homéostasie des lipides au sein même de la cellule de Kupffer.

Afin de déterminer si cette dérégulation était en partie responsable du phénotype pro-inflammatoire des fat-laden KC, nous avons utilisé un inhibiteur de la lipogenèse. En inhibant la lipogenèse *de novo* chimiquement grâce au TOFA (pour l'anglais *5-(tetradecyloxy)-2-furoic acid*), le phénotype pro-inflammatoire des fat-laden KC étaient abrogés. Par ailleurs, ce mécanisme n'était pas spécifique de la KC puisque les productions de cytokines/chimiokines de type M1 des macrophages du TA issus de souris obèses était également inhibées par le TOFA. L'ensemble de ces données a donc permis de prouver que le métabolisme de la KC est perturbé au cours de la stéatose et est directement responsable de son profil pro-inflammatoire.

***L'ensemble de ces résultats établissant le rôle de la KC dans la progression vers la NASH est présenté dans l'article 1 publié dans Journal of Hepatology en 2012. J'ai participé aux expérimentations, à l'analyse des résultats ainsi qu'aux expérimentations permettant de répondre aux reviewers.***

En prenant en compte ces données en cours d'acquisition et la bibliographie grandissante sur le rôle potentiellement délétère du fructose dans la NAFLD, nous avons voulu étudier si ces effets délétères pouvaient passer par une activation exacerbée de la KC.

Dans notre modèle murin d'obésité induit par un régime hyperlipidique, j'ai analysé l'influence de l'apport du fructose (F) sur un régime enrichi ou non en graisse HFD (pour l'anglais *High Fat Diet*) sur l'apparition des lésions hépatiques. De cette façon, la comparaison se faisait entre quatre groupes de souris nourries avec : un régime contrôle ND (pour l'anglais *Normal Diet*), un régime enrichi en graisses (HFD), un régime enrichi en fructose (F) ou un régime associant graisses et fructose (HFD/F). Au terme des 16 semaines de régime, le phénotype des souris des différents groupes a été évalué. Le statut métabolique a pris en compte le poids, la glycémie, la sensibilité au glucose. L'atteinte hépatique a été estimée par anatomo-pathologie, dosages biochimiques des transaminases plasmatiques et des triglycérides hépatiques. L'inflammation a également été évaluée en quantifiant en cytométrie en flux les lymphocytes intra-hépatiques et en établissant le profil des KC. La production de cytokines et chimiokines a été évaluée par quantification de leurs ARNm en PCR quantitative. Par ailleurs, pour compléter l'étude nous avons déterminé les différentes populations bactériennes du microbiote intestinal par FISH (pour l'anglais *Fluorescence In Situ Hybridation*) couplée à la cytométrie en flux.

L'ajout de fructose dans l'alimentation des souris (groupe ND/F) n'entraîne pas de lésions hépatiques et de sensibilité au glucose par rapport aux souris témoins (ND). En revanche, l'ajout de fructose au régime riche en graisses (HFD/F) entraîne une augmentation des lésions hépatiques en termes de stéatose et d'infiltrat lymphocytaire, ainsi qu'une sensibilité au glucose.

Notre hypothèse a donc été que cette infiltration lymphocytaire augmentée était due au profil pro-inflammatoire augmentée dans les KC des souris HFD/F. Cependant, le profil des KC était nettement moins activé chez ces souris HFD/F comparées aux souris HFD. Contrairement aux résultats présentés dans l'article 1, l'ajout de fructose au régime gras n'induit pas les mêmes modifications sur l'activation des KC qu'un régime gras sans fructose, malgré une infiltration lymphocytaire hépatique augmentée.



L'étude du MI montre que le fructose a clairement un impact sur l'ensemble du microbiote comme le montre les analyses en composante principale. Cependant, l'étude à un niveau plus spécifique a montré que les souris recevant un régime additionné en fructose, aussi bien ND/F que HFD/F, présentaient comme seule différence significative une augmentation des bactéries appartenant aux *Erysipelotrichi*, classe bactériennes du phyla des *Firmicutes*.

Ce travail a permis de mettre en évidence que l'ajout de fructose entraîne une dysbiose intestinale. Cette dysbiose est différente si l'alimentation est enrichie en graisses. Les mécanismes sur les lésions hépatiques semblent différents et liés à la consommation associée ou non aux graisses contenues dans le régime.

***L'ensemble de ces résultats est présenté dans l'article 2 soumis à PlosOne en juillet 2015 et actuellement en cours de reviewing. J'ai participé aux expérimentations, à l'analyse des résultats, à l'écriture et la conception des figures du papier.***

## I.2. Articles

### **Toxic lipids stored by Kupffer cells correlates with their pro-inflammatory phenotype at an early stage of steatohepatitis**

*Anne Leroux, **Gladys Ferrere**, Vanessa Godie, Frédéric Cailleux, Marie-Laure Renoud,  
Françoise Gaudin, Sylvie Naveau, Sophie Prévot, Samira Makhzami, Gabriel Perlemuter et  
Anne-Marie Cassard-Doucier*

*Journal of Hepatology, 57, 141–149, juillet 2012*



# Toxic lipids stored by Kupffer cells correlates with their pro-inflammatory phenotype at an early stage of steatohepatitis

Anne Leroux<sup>1,2</sup>, Gladys Ferrere<sup>1,2</sup>, Vanessa Godie<sup>1,2</sup>, Frédéric Cailleux<sup>1,2</sup>, Marie-Laure Renoud<sup>1,2</sup>,  
 Françoise Gaudin<sup>1,2,3</sup>, Sylvie Naveau<sup>1,2,4</sup>, Sophie Prévot<sup>2,5</sup>, Samira Makhzami<sup>6</sup>,  
 Gabriel Perlemuter<sup>1,2,4</sup>, Anne-Marie Cassard-Doulcier<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM U996, Clamart F-92140, France; <sup>2</sup>Univ Paris-Sud, Faculté de médecine Paris-Sud, Kremlin-Bicêtre F-94270, France;

<sup>3</sup>Institut Paris-Sud d'Innovation Thérapeutique (IPSIT), IFR141, Faculté de Pharmacie, Univ Paris-Sud 11, Châtenay-Malabry F-92296, France;

<sup>4</sup>AP-HP, Hôpital Antoine Bécère, Service d'hépatogastroentérologie, Clamart F-92140, France; <sup>5</sup>AP-HP, Hôpital Antoine Bécère, Service d'anatomie pathologique, Clamart F-92140, France; <sup>6</sup>INRA-Plateforme Iso Cell Express, Jouy-en-Josas, F-78350, France

In memory of Professor Dominique Emilie.

**Background & Aims:** Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is characterized by steatosis associated with liver inflammation. Steatosis causes recruitment of lymphocytes into the liver and this is worsened by lipopolysaccharides (LPS). As macrophages may be involved in the lymphocyte homing, we studied the role of lipids in determining the phenotype of Kupffer cells (KCs) at the stage of steatosis.

**Methods:** Steatosis was induced in mice by a high fat diet. The turnover and the recruitment of KCs were analyzed *in vivo* by flow cytometry. KCs phenotype was assessed by optical and electron microscopy, cell culture and lymphocyte recruitment by *in vitro* chemotaxis. Lipidomic analysis was carried out by mass-spectrometry and gene expression analysis by TaqMan low density array.

**Results:** Although the number of KCs was not modified in steatotic livers compared to normal livers, their phenotypes were different. Electron microscopy demonstrated that the KCs from fatty livers were enlarged and loaded with lipid droplets. Lipid synthesis and trafficking were dysregulated in fat-laden KCs and toxic lipids accumulated. Fat-laden KCs recruited more CD4<sup>+</sup> T and B lymphocytes in response to LPS stimulation than did control KCs and produced high levels of pro-inflammatory cytokines/chemokines, which could be reversed by inhibition of lipogenesis.

**Conclusions:** Lipid accumulation in fat-laden KCs is due to a dysregulation of lipid metabolism and trafficking. Fat-laden KCs are "primed" to recruit lymphocytes and exhibit a pro-inflammatory phenotype, which is reversible with inhibition of lipogenesis.

© 2012 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** NASH; Kupffer cells; Inflammation; Lipidomic; Obesity.

Received 7 October 2011; received in revised form 27 January 2012; accepted 10 February 2012; available online 14 March 2012

\*Corresponding author. Address: INSERM U996, 32 rue des Carnets, Clamart F-92140, France. Tel.: +33 1 41 28 80 37; fax: +33 1 46 32 79 93.

E-mail address: cassard.doulcier@u-psud.fr (A.-M. Cassard-Doulcier).

**Abbreviations:** NASH, non-alcoholic steatohepatitis; LPS, lipopolysaccharide; KC, Kupffer cell; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; IFN $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; IL, interleukin; ND, normal diet; HFD, high fat diet; TG, triacylglycerol; NPC, non-parenchymateous cells; TOFA, 5-(tetradecyloxy)-2-furoic acid; TLDA, TaqMan low density array; OGTT, oral glucose tolerance test; HOMA, homeostasis model assessment of insulin-resistance; ALT, alanine aminotransferase; CCL, C-C motif chemokine ligand; ATM, adipose tissue macrophages; FA, fatty acid; FAS, fatty acid synthase; ACC1, acetyl-CoA carboxylase 1; ChREBP, carbohydrate-responsive element binding protein; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; FABP, fatty acid-binding protein; FATP5, fatty acid transport protein 5; DGAT, diacylglycerol acyltransferase; SCD1, stearoyl-CoA desaturase 1; CPT1A, carnitine palmitoyltransferase 1A; HMG-CoA,  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl coenzyme A; ACAT1, acyl-CoA cholesterol acyltransferase 1; CE, cholesterol esters; ABCA6, ATP binding cassette transporter A6; MARCO, macrophage receptor with collagenous structure; LDL, low-density lipoprotein; TLR, toll like receptors; MTP, microsomal triglyceride transfer protein; VLDL, very low-density lipoprotein; LXR $\alpha$ , liver X receptors alpha; MSR1 (SR-AI), macrophage scavenger receptor; FC, free cholesterol; DAG, diacylglycerol; CXCL10, C-X-C motif chemokine 10; SREBP1c, sterol regulatory element binding proteins isoform 1c; SR-PSOX, scavenger receptor binding phosphatidylserine and oxidized lipoprotein.

## Introduction

The prevalence of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is increasing worldwide and is linked to the expansion of obesity and type 2 diabetes [1]. NAFLD ranges from pure steatosis to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma [2]. Obesity with or without associated insulin resistance is largely involved in excessive fat accumulation in the liver [3]. Although weight loss and correction of insulin resistance are relevant therapeutic targets to improve NASH [4], there is currently no treatment for advanced NAFLD [3]. In this regard, understanding the mechanisms responsible for the inflammatory processes leading to NASH remains a significant challenge.

Recruitment of inflammatory cells into the liver and their subsequent activation are key steps in the progression of liver disease. NAFLD is associated with altered hepatic lymphocyte subsets [5] including reduced numbers of hepatic NKT lymphocytes and T regulatory lymphocytes. Correcting these NKT or T regulatory lymphocyte deficiencies by adoptive transfer in



ELSEVIER

## Research Article

murine models of NASH reduces liver damage [6,7]. In addition to the redistribution of hepatic lymphocyte subsets, we have shown that liver inflammation in obese mice results not only from steatosis but also from lymphocyte hyper-responsiveness to chemotactic agents [8].

The liver contains an array of potential antigen-presenting cells, including Kupffer cells (KCs), which could participate in the redistribution of hepatic lymphocyte subsets during NAFLD. KCs constitute 20–25% of the non-parenchymal cells in the liver. KCs are the primary source of hepatic pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) [9]. In addition to their essential role as phagocytes, KCs participate in liver T cell tolerance [10]. Consequently, modified KC phenotypes could be involved in an altered immune response by disrupting T cell tolerance in the liver. Macrophage phenotypes are based on the presence of specific receptors and on the cytokines and chemokines they produce, classifying them into two subsets defined as M1 and M2 [11]. M1 macrophages are induced by pro-inflammatory mediators, such as lipopolysaccharide (LPS) or interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), and produce pro-inflammatory cytokines and chemokines. Conversely, M2 macrophages are stimulated by interleukin (IL) 4 and IL13 and this stimulation induces low levels of pro-inflammatory cytokines and high levels of IL10. In a recent study that addressed the role of lipid metabolism in macrophage activation, lipogenesis was found to be a pre-requisite for macrophage activation [12]. We therefore aimed at studying the involvement of lipids in determining KC phenotypes at the step of steatosis.

## Materials and methods

### Animals and diets

C57BL/6J and *ob/ob* mice were purchased from Janvier (France) and maintained under a 12-h light/dark schedule, with food and water *ad libitum* and treated in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 1996). Mice were fed either a normal diet (ND) or a high-fat diet (HFD) (Safe, France) as described in [Supplementary Materials](#).

### Lipidomic analysis

Hepatic triacylglycerols (TGs) were extracted with a chloroform-methanol mixture and separated by thin layer chromatography. TGs were then extracted from the silica plate with acetone and measured with a colorimetric diagnostic kit (Triglycerides FS; Diasys). For lipidomic analysis, the liver and KCs were homogenized in 1 ml of methanol/water (2:1, v/v) containing 5 mM EGTA. Lipids were extracted and molecular species were quantified by gas liquid chromatography as previously described [13].

### Isolation and culture of KCs

Livers were homogenized and non-parenchymal cells (NPC) and KCs were recovered as described in [Supplementary Materials](#). NPC were resuspended in PBS 2% FCS prior to staining with mAbs and flow cytometry analysis. KCs ( $10^6$  cells) were plated in RPMI, 10% FCS (PAA, Austria) and 1% penicillin/streptomycin for 24 h and then stimulated with 100 ng/ml LPS from *Escherichia coli* serotype O55:B5 endotoxin-free (Alexis, Switzerland) or not for 24 h. For TOFA (5-(tetradecyloxy)-2-furoic acid) (Merrel National Laboratories, USA) exposure, KCs were treated with 200  $\mu$ M TOFA for 24 h. KC culture supernatants were stored frozen or used in an *in vitro* chemotaxis assay. Cell viability was evaluated by trypan blue and was higher than 90%. There was no contamination by hepatocytes. The purity was assessed by F4/80, CD31, and CD11c labeling and ranged from 85% to 89% with some contamination by endothelial cells (4.8%) or dendritic cells (2.4%) (data not shown).

### Liver monocyte recruitment

Aggregates of PKH26-PCL (0.1 mM; Sigma, MO) or saline were intravenously injected into mice fed with HFD or ND at the age of 4 weeks. Mice fed the HFD and ND diets were sacrificed 4, 8, 12, and 16 weeks after the PKH26-PCL or saline injection. Macrophages were stained with a rat anti-F4/80 mAb (AbD Serotec, UK) and analyzed using a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson, USA).

### Lymphocyte recruitment assay

Lymphocyte chemotaxis was evaluated using a Transwell® system (5  $\mu$ m pores, Corning Costar, MA). Splenocytes from lean mice were purified by centrifugation through a Lympholyte® density gradient (Cedarlane, Canada) at 800 g for 20 min. Lymphocytes were stained with anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, and anti-CD19 mAbs. KC supernatants were placed in the lower chamber and  $1.5 \times 10^6$  lymphocytes in 150  $\mu$ l were placed into the upper chamber (same culture medium in both chambers). Uncultured medium in the lower chamber with  $1.5 \times 10^6$  cells in the upper chamber were used as input control. After 4 h of incubation, cells in the lower chamber were analyzed by flow cytometry. To quantify the lymphocytes subsets infiltrating the liver, anti-CD45 or antibodies described above were used. NPC were stained and we counted the number of labeled lymphocytes per g of liver.

### RNA and TaqMan low-density array analysis (TLDA)

RNAs were extracted using the RNeasy Lipid Tissue kit (Qiagen, CA) including a DNase treatment. TLDA was performed following the manufacturer's instructions and described in [Supplementary Materials](#).

### Statistical analysis

All analyses were performed using the StatView (version 5.0 statistical software system (Abacus Concepts, CA)).

## Results

### HFD-induced steatosis does not modify recruitment of KCs

To determine whether KCs were involved in the early steps of NASH, C57BL/6J mice were fed the HFD for 16 weeks. This diet induced a mean weight gain of 26% ( $\pm 4\%$ ) and obesity-related metabolic disorders ([Table 1](#)). Insulinemia, blood glucose levels, oral glucose tolerance test (OGTT) results and calculated homeostasis model assessment of insulin-resistance (HOMA) clearly demonstrated that the HFD mice were insulin-resistant. The plasma levels of TGs, leptin, resistin, and CCL2 were significantly higher in HFD mice compared to those of ND mice. The HFD mouse liver exhibited clear signs of steatosis and had TG levels that were fourfold higher than the liver TG levels of ND mice ([Fig. 1A](#) and [B](#)). Alanine aminotransferase (ALT) levels were not significantly modified by the HFD diet ([Table 1](#)). There was no liver inflammation in HFD mice, as shown by the absence of inflammatory infiltrates at histological examination and by the numbers of liver CD45 lymphocytes on flow cytometry analysis, which were not higher than those of ND mice ([Fig. 1A](#) and [C](#)). Therefore, HFD mice were at an early step of NAFLD, with a fatty liver but no significant inflammation.

To study the number of KCs and their recruitment to the liver during steatosis development, we injected mice intravenously with aggregates of PKH26 [14]. After 24 h, more than 95% of KCs were PKH26+ and all monocytes were PKH26- (data not shown). Mice were then maintained on HFD or ND for 4, 8, 12, or 16 weeks. Recruitment of new liver macrophages was assessed by the number of PKH26-/F4/80+ cells found in the liver. The

**Table 1. Characteristics of ND and HFD mice.**

	ND	HFD
Mice weight (g)	29.36 ± 0.30	39.73 ± 1.4***
Liver weight (g)	1.52 ± 0.038	1.48 ± 0.049
ALT (IU/L)	173.31 ± 43.03	155.67 ± 39.73
Epididymal adipose tissue weight (g)	0.41 ± 0.03	2.19 ± 0.21**
Plasma TG	0.51 ± 0.014	0.86 ± 0.079*
Blood glucose (mg/dl)	119 ± 11.61	172.55 ± 5.45*
Insulin (pg/ml)	162.06 ± 17.31	654.23 ± 80.41***
HOMA	1.23 ± 0.20	7.14 ± 0.96***
OGTT (arbitrary unit)	30,162 ± 312	37,055 ± 1182*
Leptin (pg/ml)	273.72 ± 64.52	7085.52 ± 828.11***
Resistin (pg/ml)	833.05 ± 57.35	1391.21 ± 95.94***
IL6 (pg/ml)	20.9 ± 8.89	22.99 ± 5.66
CCL2 (pg/ml)	24.72 ± 7.31	55.91 ± 5.98*

Mice were fed either ND or HFD for 16 weeks. Data represent the mean ± SEM of groups of at least eight mice. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , and \*\*\* $p < 0.0001$ . Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test.

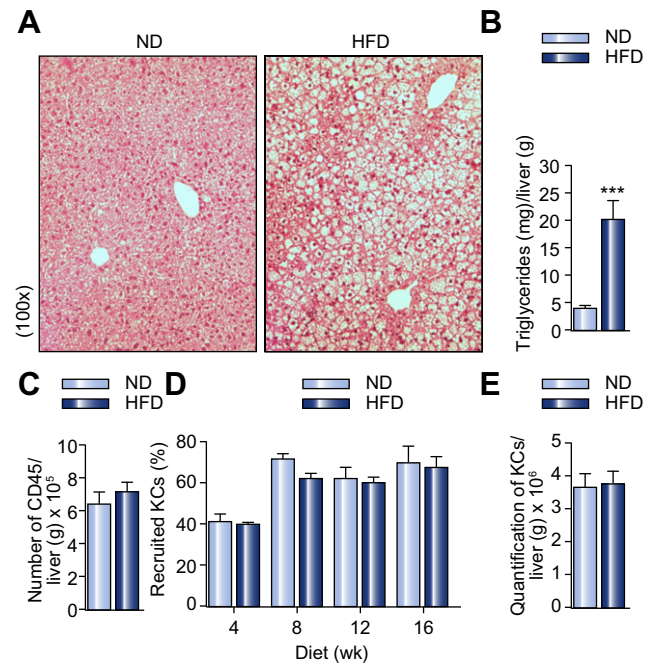
percentage of recruited KCs was similar for ND and HFD mice suggesting that accumulation of fat in the liver does not modify monocyte recruitment (Fig. 1D). This was confirmed by quantifying total liver KCs by flow cytometry or immunohistochemistry, for which there were no significant differences between HFD and ND mice (Fig. 1E and Supplementary Fig. 1).

#### HFD-induced steatosis led to lipid accumulation in KCs

As the number of Kupffer cells in a steatotic liver was unchanged compared to a normal liver, we assessed their phenotype. The morphology of KCs from HFD mice was different from that of KCs from ND mice. Indeed, observation by optic microscopy and Red Oil labeling showed that neutral lipids had accumulated in the cytoplasm of KCs and these cells were larger than those of ND mice (Fig. 2A). These observations were confirmed by electron microscopy which demonstrated the accumulation of numerous and enlarged lipid droplets in the cytoplasm of KCs from HFD (Fig. 2B). This lipid droplets accumulation is also observed in adipose tissue macrophages (ATMs) and in KCs from another model of NASH, *ob/ob* mice (Supplementary Figs. 2A and 3A).

#### Dysregulation of genes expression involved in lipid metabolism in fat-laden KCs

To study the mechanisms involved in lipid accumulation of KCs, we determined by TLDA the gene expression levels of enzymes involved in lipid metabolism and transport (Table 2). The *de novo* fatty acid (FA) synthesis pathways were altered in the KCs of HFD mice. Fatty acid synthase (*Fas*) gene expression was significantly higher, although acetyl-CoA carboxylase 1 (*Acc1*) gene expression was unaltered. This increase could be relayed by elevated expression levels of the carbohydrate-responsive element binding protein 1 (*Chrebp1*) and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (*Ppar\gamma*) genes, which were also upregulated. The FA transporters gene expression such as FA binding proteins 2 gene (*Fabp2*)

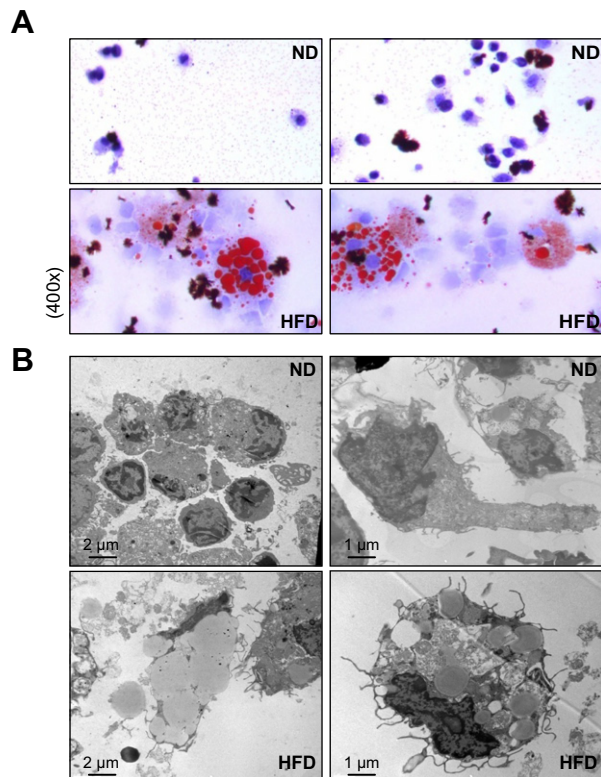


**Fig. 1. No modification of KCs recruitment in the liver of HFD mice at the step of pure steatosis.** (A) Histological examination of liver tissue from mice maintained for 16 weeks on the ND or the HFD: macro-vesicular and micro-vesicular steatosis. (B) Hepatic triglyceride content and (C) quantification by flow cytometry of CD45+ lymphocytes from ND and HFD mice after 16 weeks on their respective diets. Data represent the mean ± SEM of 14 animals. (D) Mice were injected iv with PKH26 aggregates before starting the diet. PKH26+ and PKH26-KCs in the livers of mice were quantified by flow cytometry after 4, 8, 12, and 16 weeks of ND or HFD. The percentage represents the recruited KCs (PKH26-) vs. the non-recruited KCs (PKH26+). Data represent the mean ± SEM of four animals. (E) Quantification of KCs by flow cytometry after 16 weeks of ND or HFD. Data represent the mean ± SEM of 14 animals. (Mann-Whitney, \*\*\* $p < 0.0001$ ).

and fatty acid transport protein 5 (*Fatp5*) was also increased. The TG synthesis pathway was also activated as shown by a 3.98-fold increase in diacylglycerol acyltransferase 2 (*Dgat2*) gene expression. The stearoyl-CoA desaturase 1 (*Scd1*) gene was upregulated, suggesting that the storage of unsaturated lipids was increased. Upregulation of the *Ppar\alpha* gene and one of its targets carnitine palmitoyltransferase 1A (*Cpt1A*) suggested an increase in  $\beta$ -oxidation.

We found that the cholesterol metabolism was dysregulated as the  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl coenzyme A (*Hmg-CoA*) gene expression was downregulated. The expression level of the acyl-CoA cholesterol acyltransferase 1 (*Acat1*) gene, which encodes one of the enzymes required for the cholesterol esters (CE) synthesis, was not significantly modified. The expression of the ATP-binding cassette transporter A6 (*Abac6*) gene, which belongs to a family of transporters involved in the cholesterol efflux [15], was higher in KCs from HFD mice. Among the scavenger receptors involved in the uptake of modified LDLs (oxidized or acetylated), several were significantly upregulated, such as macrophage receptor with collagenous structure (*Marco*) and *Cd163*. As some toll like receptors (TLRs) could bind fatty acids and/or are known to be involved in NASH such as TLR4, TLR2, and TLR9 [16], we analyzed their expression. TLR2 and TLR4 were not modified but we found a large increase of TLR6 and TLR9 expression which were, at least for TLR9, previously involved in NASH development [17]. Expression of the microsomal TG





**Fig. 2. Morphological analysis of KCs.** (A) KCs, from mice sacrificed after 16 weeks of diet, stained with Red Oil and examined by light microscopy. (B) Electron microscopy of KCs from ND and HFD mice.

transfer protein (*Mtp*) gene, which encodes a key molecule for VLDL assembly and export, was markedly increased. The higher expression levels of liver X receptor  $\alpha$  (*Lxr\alpha*) gene, and the *Ppar\alpha* gene, which are involved in the upregulation of cholesterol efflux from macrophages, suggested that cholesterol trafficking was stimulated [18]. These differences of expression were also observed except for two membrane receptor, *Msr1* and *TLR9*, in another advanced model of NASH, *ob/ob* mice. As gene expression of several enzymes involved in lipid synthesis and trafficking was dysregulated, we assessed the lipid species that accumulated in the total liver and specifically in KCs.

#### Toxic lipids are concentrated in fat-laden KCs

Lipidomic analysis showed that TG accumulation was significantly higher in total liver from HFD mice compared to that of ND mice (Table 3). In contrast, the total amounts of TGs in ND and HFD KCs were not significantly different. However, the levels of some TG species were significantly higher in KCs from HFD mice (Table 3).

The levels of free cholesterol (FC) and CE were higher in both the total liver and KCs from HFD mice compared to ND mice (Table 3). The same species of CE were higher in the total liver and in KCs.

Diacylglycerols (DAGs) are toxic lipids since they activate pro-inflammatory and nutrient-sensing pathways [19,20]. The amount of DAGs was much higher in HFD KCs than in ND KCs (Table 3). In contrast, DAG content was significantly lower in total liver extracts from HFD mice compared to that of ND mice.

Sphingolipids, including ceramides, are involved in many biological processes including inflammation [21]. Total sphingomyelin levels were similar in livers and KCs from ND and HFD mice (data not shown). Conversely, the total ceramide level was significantly higher for the KCs of HFD mice than for the KCs of ND mice (Table 3). The species of ceramides were also substantially redistributed. In contrast, the ceramide levels in total livers extracts of HFD and ND mice were not significantly different. Overall, these results demonstrate that lipid homeostasis in the KC from HFD mice was profoundly dysregulated with higher amounts of toxic lipids in fat-laden KCs.

#### Lipogenesis induces a pro-inflammatory phenotype of fat-laden KCs

In response to LPS challenge, KCs from HFD mice secreted more pro-inflammatory cytokines and chemokines than KCs from ND mice (Fig. 3A). In particular, KCs from HFD mice secreted more IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL10, CCL2, and CCL5 under basal conditions and after LPS challenge than did the KCs from ND mice (Fig. 3B). Secretion of IL6, IL1 $\beta$ , and CXCL10 was higher in KCs from HFD mice than in KCs from ND mice only after LPS challenge.

We then inhibited the acetyl-CoA carboxylase (ACC), first step of lipogenesis, by TOFA in short term experiments. The inhibition of lipogenesis decreased the production of these pro-inflammatory cytokines/chemokines (Fig. 3C and D). Moreover, we observed a similar inhibition of the pro-inflammatory phenotype under lipogenesis inhibitor in KCs from another model of NASH, *ob/ob* mice and also in ATMs (Supplementary Figs. 2 and 3). This result demonstrates that lipid accumulation in KCs and ATM correlated with the pro-inflammatory phenotype of KCs and is reversible with inhibition of lipogenesis.

#### Pro-inflammatory fat-laden KCs induced a higher recruitment of lymphocytes

HFD mice challenged by LPS showed a higher recruitment of CD45+ lymphocytes into the liver compared to ND mice (Fig. 4A). To further analyze the involvement of KCs from HFD mice in recruiting lymphocytes to the liver, we tested the ability of KCs to recruit lymphocytes *in vitro* using a chemotaxis assay. KCs from HFD-fed mice or their lean controls were incubated with or without LPS for 24 h and the resulting culture supernatants were loaded into the lower chamber of a transwell system. Freshly isolated splenocytes from C57BL/6J mice, labeled with antibodies to lymphocyte markers, were loaded in the upper chamber. Uncultured medium in the lower chamber with  $1.5 \times 10^6$  cells in the upper chamber were used as input control. Lymphocyte migration into the lower chamber was quantified by flow cytometry. The culture supernatant from KC of HFD-fed mice recruited significantly more CD4+ T and B cells than the control supernatant (Fig. 4C). *In vivo*, LPS challenge showed that the recruitment of lymphocytes subsets into the liver was also increased (Fig. 4B). Overall, these results demonstrate that KCs from HFD mice are “primed” to recruit lymphocytes.

#### Discussion

We have previously shown that liver inflammation in obese mice results not only from lymphocyte hyper-responsiveness to

Table 2. Quantification of gene expression in KCs from ND, HFD and *ob/ob* mice.

Gene symbol	2 <sup>-ΔCT</sup> ND	2 <sup>-ΔCT</sup> HFD	Fold HFD vs. ND	p value HFD vs. ND	2 <sup>-ΔCT</sup> <i>ob/ob</i>	Fold <i>ob/ob</i> vs. ND	p value <i>ob/ob</i> vs. ND
<b>Lipid metabolism</b>							
<i>Srebp1c</i>	2.00 ± 0.09	2.00 ± 0.08	0.99	n.s.	2.00 ± 0.00	0.91	n.s.
<i>Chrebp</i>	0.13 ± 0.09	0.58 ± 0.14	1.71	*	0.40 ± 0.25	1.98	n.s.
<i>Ppara</i>	<0.01 ± 0.00	0.61 ± 0.12	3.10	***	1.00 ± 0.32	5.09	*
<i>Pparγ</i>	1.25 ± 0.11	2.11 ± 0.24	1.67	*	2.60 ± 0.40	2.18	*
<i>Lxra</i>	4.13 ± 0.33	15.60 ± 1.29	3.82	***	15.60 ± 2.29	3.80	**
<i>Fas</i>	2.07 ± 0.15	2.63 ± 0.30	1.37	*	4.40 ± 1.03	2.24	*
<i>Acc1</i>	1.81 ± 0.10	1.74 ± 0.10	0.93	n.s.	2.00 ± 0.00	1.04	n.s.
<i>Scd1</i>	24.88 ± 3.93	87.79 ± 15.78	3.54	**	252.00 ± 68.30	10.17	**
<i>Dgat1</i>	2.31 ± 0.12	2.05 ± 0.05	0.89	*	2.20 ± 0.20	0.99	n.s.
<i>Dgat2</i>	1.31 ± 0.20	5.00 ± 0.87	3.98	**	6.00 ± 1.34	4.85	*
<i>Cpt1a</i>	6.69 ± 0.50	8.16 ± 0.36	1.24	*	8.60 ± 0.81	1.28	0.09
<i>Hmg-CoA</i>	4.80 ± 0.24	3.59 ± 0.17	0.78	***	3.75 ± 0.48	0.79	0.08
<i>Acat1</i>	11.40 ± 1.34	9.42 ± 0.58	0.83	n.s.	10.80 ± 1.32	0.93	n.s.
<b>Lipid transporter</b>							
<i>Fabp2</i>	0.75 ± 0.31	2.37 ± 0.47	2.94	*	4.40 ± 1.17	5.53	*
<i>Fabp4</i>	193.44 ± 26.25	142.37 ± 17.52	0.74	n.s.	355.00 ± 50.70	1.83	*
<i>Fatp5</i>	1.13 ± 0.27	6.37 ± 1.36	5.43	*	7.80 ± 2.18	6.58	*
<i>Mtp</i>	0.44 ± 0.20	4.95 ± 1.03	7.81	**	7.40 ± 2.06	11.69	*
<i>Abca6</i>	0.31 ± 0.12	1.83 ± 0.34	4.38	**	2.60 ± 0.75	6.55	*
<b>Scavenger receptor</b>							
<i>Cd36</i>	14.75 ± 0.99	14.47 ± 0.49	0.99	n.s.	15.00 ± 1.08	1.05	n.s.
<i>Cd163</i>	3.69 ± 0.62	12.32 ± 1.13	3.44	***	14.40 ± 1.33	3.97	**
<i>Marco</i>	5.44 ± 1.03	36.68 ± 6.65	6.73	**	31.60 ± 8.15	5.78	**
<i>Msr1 (Sr-ai)</i>	62.75 ± 3.99	52.63 ± 3.23	0.84	n.s.	102.00 ± 6.89	1.62	*
<i>Msr2</i>	0.19 ± 0.10	<0.01 ± 0.00	0.58	***	0.00 ± 0.00	0.35	**
<i>Sr-psox</i>	44.47 ± 3.01	28.74 ± 1.09	0.65	***	35.00 ± 3.29	0.80	0.10
<b>Cytokine</b>							
<i>Tgfb1</i>	40.90 ± 2.42	33.20 ± 1.43	0.82	*	33.00 ± 3.74	0.81	0.08
<i>Il6</i>	0.50 ± 0.13	0.83 ± 0.25	1.63	n.s.	1.00 ± 0.32	1.60	n.s.
<i>Tnfa</i>	5.00 ± 0.51	5.89 ± 0.64	1.18	n.s.	7.00 ± 0.84	1.45	0.07
<i>Il1b</i>	10.90 ± 1.33	18.90 ± 2.25	1.72	*	23.40 ± 4.06	2.15	*
<i>Il10</i>	0.63 ± 0.13	2.32 ± 0.50	4.19	*	2.80 ± 0.80	5.15	***
<b>TLR</b>							
<i>Tlr2</i>	3.81 ± 0.23	3.58 ± 0.18	0.96	n.s.	3.40 ± 0.51	0.91	*
<i>Tlr4</i>	15.20 ± 0.89	15.60 ± 0.71	1.01	n.s.	15.00 ± 1.79	0.97	n.s.
<i>Tlr5</i>	<0.01 ± 0.00	<0.01 ± 0.00	1.29	n.s.	<0.01 ± 0.00	1.51	n.s.
<i>Tlr6</i>	0.06 ± 0.06	0.58 ± 0.12	9.25	***	0.60 ± 0.25	9.61	0.07
<i>Tlr9</i>	1.19 ± 0.10	1.89 ± 0.19	1.57	**	0.80 ± 0.20	0.67	*

mRNAs from KCs of ND, HFD and *ob/ob* mice were isolated and subjected to TLDA as described in Materials and methods. Results are expressed relative to the expression levels in ND mice and represent the mean ± SEM and were multiplied by an arbitrary factor: 10<sup>4</sup>; n = 16 for ND mice, n = 19 for HFD mice and n = 4 for *ob/ob* mice; \*p < 0.05, \*\*p < 0.001, and \*\*\*p < 0.0001. Statistical analysis was performed using the Student's *t* test between ND and HFD mice and the Mann-Whitney test between ND and *ob/ob* mice.

chemotactic agents, but also from steatosis [8]. KCs are the primary source of pro-inflammatory cytokines and chemokines in the liver. Consequently, modified KC phenotypes could be

involved in an altered immune response by disrupting T cell tolerance. In this study, we investigated the involvement of lipids in determining KC phenotypes at the step of steatosis.



## Research Article

**Table 3. Fat-laden KCs produced higher levels of toxic lipids.**

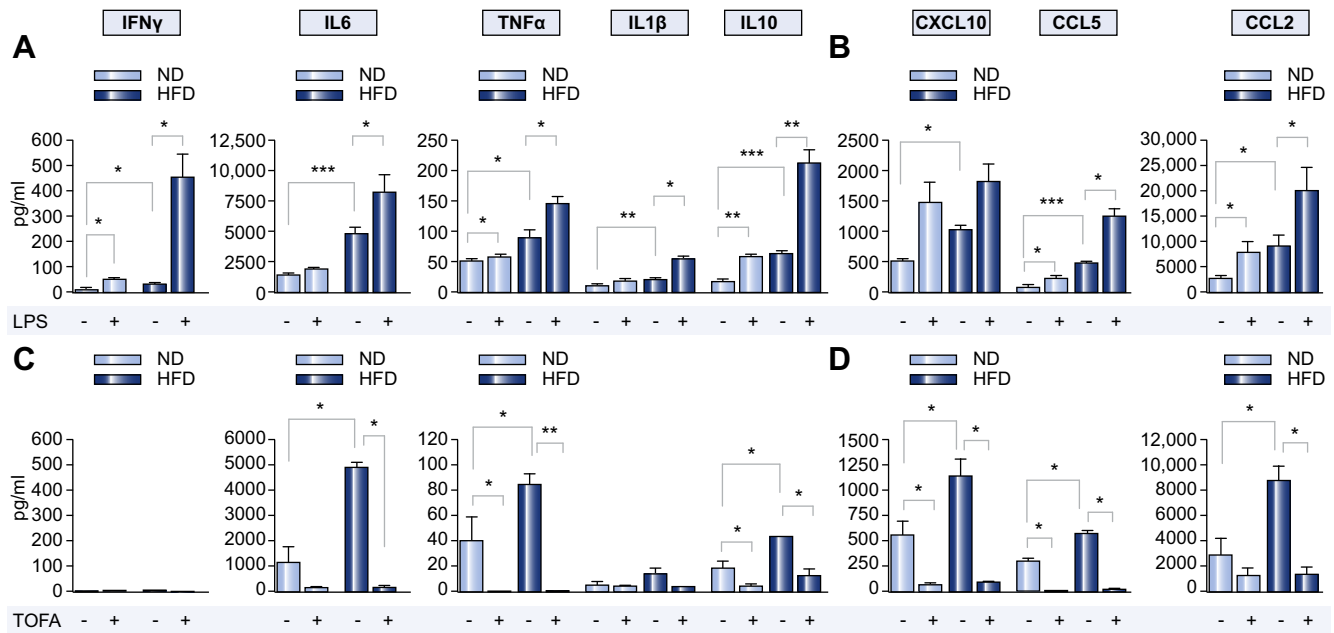
Lipid molecular species		Liver			KCs		
		ND	HFD	Fc	ND	HFD	Fc
Cholesterol		36.18 ± 3.83	40.69 ± 1.00*	1.12	4.58 ± 1.45	13.63 ± 4.04*	2.98
Cholesterol ester	C16	2.09 ± 0.26	6.23 ± 1.25*	2.98	0.10 ± 0.02	2.61 ± 1.55*	26.10
	C18	3.19 ± 0.40	7.88 ± 1.23*	2.47	0.17 ± 0.04	3.02 ± 1.59*	17.76
	C20:4	u.n.	u.n.		u.n.	0.17 ± 0.09*	
	total	5.28 ± 0.64	14.11 ± 2.44*	2.67	0.27 ± 0.06	5.80 ± 3.22*	21.48
Diacylglycerol	C33 (14/16)	0.15 ± 0.07	0.38 ± 0.10	2.53	u.n.	0.14 ± 0.06	
	C35 (16/16)	2.44 ± 0.27	2.45 ± 0.20	1.00	0.15 ± 0.03	1.02 ± 0.51*	6.80
	C37 (16/18)	11.69 ± 1.11	9.80 ± 0.77*	0.84	0.67 ± 0.13	3.89 ± 1.98*	5.81
	C39 (18/18)	16.08 ± 1.26	11.43 ± 0.76	0.71	1.36 ± 0.23	5.13 ± 2.22	3.77
	C41 (18/20)	1.89 ± 0.30	1.05 ± 0.24*	0.56	0.06 ± 0.02	0.66 ± 0.37	11.00
	total	32.25 ± 2.67	25.13 ± 1.24*	0.78	2.24 ± 0.41	10.84 ± 5.12*	4.84
Triacylglycerol	C49 (14/16/16)	2.66 ± 0.78	10.50 ± 2.94*	3.95	1.46 ± 0.25	8.98 ± 4.07*	6.15
	C51 (16/16/16)	5.66 ± 0.93	42.92 ± 13.88*	7.58	1.50 ± 0.37	44.37 ± 23.89*	29.58
	C53 (16/16/18)	43.70 ± 7.25	168.40 ± 56.44*	3.85	8.25 ± 2.04	135.75 ± 56.57*	16.45
	C55 (16/18/18)	105.97 ± 16.78	292.61 ± 83.54	2.76	18.79 ± 4.83	219.81 ± 82.80*	11.70
	C57 (18/18/18)	36.52 ± 6.11	61.88 ± 19.82	1.69	7.00 ± 2.51	67.33 ± 33.03	9.62
	total	194.52 ± 31.00	576.30 ± 175.31*	2.96	36.99 ± 9.84	476.44 ± 197.97	12.88
Ceramide	C16:0-D18:1	0.66 ± 0.10	0.91 ± 0.30	1.38	0.12 ± 0.03	0.54 ± 0.19*	4.50
	C18:0-D18:1	u.n.	u.n.		0.04 ± 0.04	u.n.	
	C18:0-D18:2	u.n.	u.n.		0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.02	2.00
	C20:0-D18:2	0.30 ± 0.09	0.48 ± 0.14	1.60	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.02	2.00
	C22:0-D18:1	0.84 ± 0.16	1.80 ± 0.31*	2.14	0.03 ± 0.01	0.65 ± 0.42*	21.67
	C24:0-D18:1	0.36 ± 0.06	0.57 ± 0.11	1.58	0.01 ± 0.01	0.22 ± 0.13*	22.00
	C24:1-D18:1	0.67 ± 0.11	0.64 ± 0.16	0.96	0.04 ± 0.03	0.39 ± 0.27	9.75
	total	2.83 ± 0.40	4.40 ± 0.78	1.57	0.26 ± 0.10	1.81 ± 1.01*	6.00

Livers and KCs were recovered from mice after they had received ND or HFD for 16 weeks. Cholesterol, cholesterol ester, diacylglycerol, triacylglycerol, and ceramide contents were quantified by gas liquid chromatography. Data represent the mean (expressed as nmol of lipid/mg of tissue or as nmol of lipid/10<sup>6</sup> KCs) ± SEM of n = 12 animals for liver analysis; n = 4 for ND KCs; n = 9 for HFD KCs; \*p < 0.05. FC represents the fold change between the respective values determined for HFD and ND mice. Statistical analysis was performed using the Student's *t* test for liver samples and the Mann-Whitney test for KCs samples. u.n., undetected.

KCs from HFD mice with pure steatosis were enlarged and showed typical lipids droplets in their cytoplasm. It has been reported that KCs stored lipids in rabbit models of hypercholesterolemia and NASH [22,23]. The HFD enriched with 37% of fat, used in our study, induces fat-laden KCs after 16 weeks of diet conversely to a HFD with 21% of fat during 21 days [24]. While several publications have suggested that there are higher numbers of KCs in the fatty liver, this has not been clearly established. However, semi-quantitative analysis of KCs by immunohistochemistry in a choline-deficient diet inducing hepatosteatosis showed that the amount of KCs in the liver did not change [25]. Our experiments showed that the number of KCs and their recruitment were unchanged by lipid accumulation in the liver.

Macrophages are a heterogeneous population of cells, which have diverse functions and phenotypes based on their location and activation state. The inflammatory environment determines the macrophage phenotype generating different subsets. The M1 subset produces pro-inflammatory cytokines and chemokines and the M2 subset produces low levels of pro-inflammatory cyto-

kines and high levels of IL10 [11,26]. The M1/M2 classification was often determined by gene expression analysis. As we could measure the production of cytokines and chemokines, we directly assessed the inflammatory status of KCs. We have shown that fat-laden KCs produced higher level of pro-inflammatory cytokines and chemokines in basal conditions, and were more sensitive to LPS. Recently, it has been shown that adipose tissue macrophages had a similar phenotype during the obesity development [18]. However, we also detected high levels of IL10 in fat-laden KCs in addition to a typical M1 phenotype. Such an apparent contradiction may be due to KC heterogeneity; indeed, some regulatory macrophage subsets expressed high levels of IL10 without the other typical M2-associated cytokines/chemokines [27]. *In vivo*, LPS challenge induced a significant increase in the recruitment of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes and a tendency to recruit more CD19<sup>+</sup> lymphocytes. Pro-inflammatory fat-laden KCs recruited more CD4<sup>+</sup> T and B lymphocytes under an LPS challenge, showing that KCs efficiently participated in lymphocyte recruitment into the liver.



**Fig. 3. KCs from HFD mice produced pro-inflammatory cytokines and chemokines dampened by inhibition of lipogenesis.** KCs were cultured from ND or HFD mice. (A and B) Cytokines and chemokines levels produced by KCs challenged or not with LPS (100 ng/ml). Data represent the mean  $\pm$  SEM of 14 animals. (C) Cytokines and chemokines levels in the supernatant of KCs challenged or not with TOFA (200  $\mu$ M). Data represent the mean  $\pm$  SEM of four mice. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests; \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.001 and \*\*\* $p$  < 0.0001.

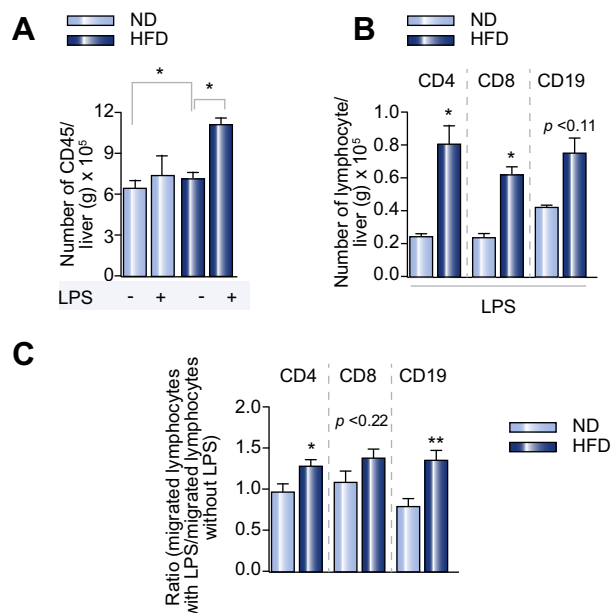
Induction of lipogenesis is a key step in the differentiation of monocytes into macrophages and suppression of FA synthesis prevents phagocytosis development and function [12]. A FAS deficiency in macrophages decreases foam cell formation and diet-induced atherosclerosis [28]. On the other hand, TG synthesis also helps protect liver cells from lipotoxicity by buffering the accumulation of FA [20]. RT-qPCR and lipidomic analysis showed that lipid homeostasis was dysregulated. DAGs, which are toxic lipids [19,20], were greatly increased in fat-laden KCs. Inhibition of TG synthesis in the liver causes DAG accumulation, which exacerbates liver damage. Conversely, specific overexpression of DGAT in macrophages increases their capacity for TG storage and protects them against inflammatory activation [29]. Here, the accumulation of DAG in KCs from HFD mice did not result from a defect in TG synthesis. The upregulation of *Scd1* suggested that the level of unsaturated FAs had increased, which could serve as a protective function against lipotoxicity through promotion of TG accumulation [20]. The inhibition of the lipogenesis via the inhibition of the ACC by TOFA in fat-laden KCs was able to reverse the pro-inflammatory phenotype. Therefore, upregulation of lipogenesis directly participates in the pro-inflammatory phenotype of fat-laden KCs. The analysis of ATMs suggests that the dysregulation of lipid metabolism profoundly disturbs the phenotype of monocytes/macrophages subsets.

Like TG and DAG, the levels of FC and CE were redistributed in the fat-laden KCs, which indicated that cholesterol homeostasis had become dysregulated. FC modify membrane fluidity and can consequently alter phagocytosis, which is known to be disturbed in murine models of NASH [30]. The role of cholesterol metabolism and especially of LDL in foam cell formation and in the development of atherosclerosis are well described [31]. Mac-

rophages are able to synthesize cholesterol and CE, and to participate via ABC transporters in cholesterol efflux [32]. Overall, our profile of gene expression suggests that the metabolism and trafficking of cholesterol and CE were modified in fat-laden KCs and could be deleterious, as shown by the improvement of atherosclerotic lesions in mice deficient for CD36 [32].

The increase of some specific ceramides in the livers of obese *ob/ob* mice has been previously described [33]. However, in our experiments, the ceramide levels in obese and control livers were similar. Conversely, ceramide levels were significantly higher in the fat-laden KCs of HFD mice and the relative levels of the ceramide species had been completely redistributed. Similarly to FC, ceramides are involved in membrane fluidity and phagocytosis. Moreover, some ceramide metabolites can activate NKT cells [34]. Liver NKT cells are decreased in NASH and the remaining liver NKT display pro-inflammatory activation [35]. Furthermore, macrophages can present antigens to NKT lymphocytes [36]. We hypothesize that the NKT pattern in NASH could be directly due to ceramide dysregulation in fat-laden KC.

In conclusion, we demonstrate that steatosis does not lead to increased recruitment of KCs into the liver, but induced an increase of their lipid content, especially toxic lipids. This lipid accumulation is associated with a disturbance of lipid metabolism encompassing lipid synthesis, oxidation, uptake, and secretion in KCs. Fat-laden KCs display a pro-inflammatory phenotype, which is reversible with inhibition of lipogenesis. The pro-inflammatory phenotype of fat-laden KCs induced an *in vitro* recruitment of lymphocytes under LPS challenge possibly contributing to the early homing of immune cells into the fatty liver. These observations are consistent with the fact that maintaining a M2 phenotype in KCs improves liver lesions in obesity [37].



**Fig. 4. Elevated lymphocyte recruitment by fat-laden KCs.** Quantification by flow cytometry of (A) CD45<sup>+</sup> lymphocytes, (B) CD4<sup>+</sup> T, CD8<sup>+</sup> T, and CD19<sup>+</sup> B lymphocytes from ND and HFD mice challenged or not with LPS (5 mg/kg of body weight). Data represent the mean  $\pm$  SEM of at least six mice except for ND mice challenged with LPS ( $n = 2$ ). (C) KCs from ND or HFD mice were cultured either with or without LPS (100 ng/ml). Splenocytes isolated from a lean mouse were labeled with antibodies and incubated in the upper transwell chamber. CD4<sup>+</sup> T, CD8<sup>+</sup> T, and CD19<sup>+</sup> B cells were quantified by flow cytometry after 4 h of incubation. Uncultured medium in the lower chamber with  $1.5 \times 10^6$  cells in the upper chamber were used as input control. The values represent the ratios of the lymphocytes that migrated in response to LPS-challenged KCs supernatants to the lymphocytes migrated in response to unstimulated KCs supernatants. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 14 animals (Mann-Whitney test \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.001$ ).

## Conflict of interest

The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

## Financial support

Supported by INSERM AVENIR, Université Paris-Sud, the National French Society of Gastroenterology (SNFGE), Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF), and National Program on diabetes Research (PNR-diabète). AL holds fellowships from conseil régional d'Ile-de-France and FC holds fellowships from the Ministère de la recherche.

## Acknowledgments

The authors thank Bernadette Besson-Lescure and Nadège Brunel from the microassay facility of IFR65; Aurélie Desquesnes from the ANEXPLO-Phenotypage platform of IFR150; Justine Bertrand-Michel from the lipidomic facility Core-MetaToul of INSERM U1048; Alain Schmitt from the electron microscopy facility of the Cochin institute; the biochemistry department of the Antoine Bécère hospital and Ghyath Maarof for transaminase

measurements. We also thank Carina Prip-Buus for helpful discussion.

## Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2012.02.028>.

## References

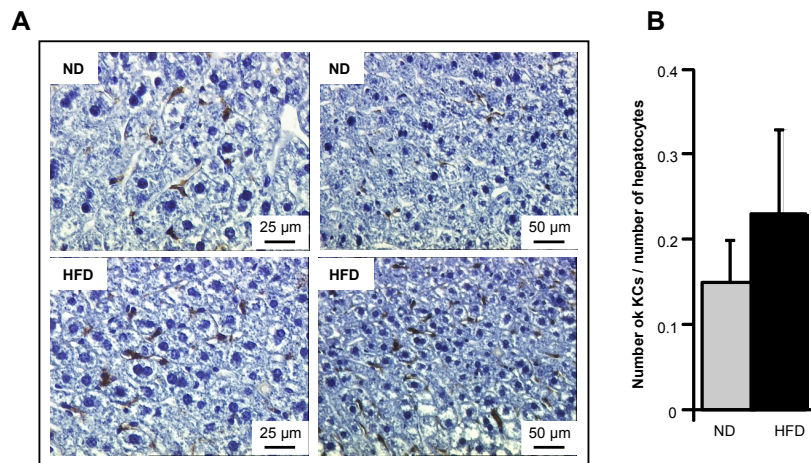
- [1] Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002;346:1221–1231.
- [2] Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. NAFLD: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999;116:1413–1419.
- [3] Perlemuter G, Bigorgne A, Cassard-Doulcier AM, Naveau S. NAFLD: from pathogenesis to patient care. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007;3:458–469.
- [4] Bugianesi E, Marzocchi R, Villanova N, Marchesini G. NAFLD/NASH: treatment. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:1105–1116.
- [5] Guebre-Xabier M, Yang S, Lin HZ, Schwenk R, Krzyzch U, Diehl AM. Altered hepatic lymphocyte subpopulations in obesity-related murine fatty livers: potential mechanism for sensitization to liver damage. *Hepatology* 2000;31:633–640.
- [6] Elinav E, Pappo O, Sklair-Levy M, Margalit M, Shibolet O, Gomori M, et al. Adoptive transfer of regulatory T lymphocytes ameliorates non-alcoholic steatohepatitis and glucose intolerance in ob/ob mice and is associated with intrahepatic CD8 trapping. *J Pathol* 2006;209:121–128.
- [7] Ma X, Hua J, Mohamood AR, Hamad AR, Ravi R, Li Z. A high-fat diet and regulatory T cells influence susceptibility to endotoxin-induced liver injury. *Hepatology* 2007;46:1519–1529.
- [8] Bigorgne AE, Bouchet-Delbos L, Naveau S, Dagher I, Prevot S, Durand-Gasselin I, et al. Obesity-induced lymphocyte hyperresponsiveness to chemokines: a new mechanism of fatty liver inflammation in obese mice. *Gastroenterology* 2008;134:1459–1469.
- [9] Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, Hernandez-Guerra M, Mayorga M, Dominguez-Diez A, et al. Gene expression of TNF alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001;34:1158–1163.
- [10] You Q, Cheng L, Kedl RM, Ju C. Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells. *Hepatology* 2008;48:978–990.
- [11] Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004;25:677–686.
- [12] Ecker J, Liebisch G, Englmaier M, Grandl M, Robenek H, Schmitz G. Induction of fatty acid synthesis is a key requirement for phagocytic differentiation of human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:7817–7822.
- [13] Besteiro S, Bertrand-Michel J, Lebrun M, Vial H, Dubremetz JF. Lipidomic analysis of *Toxoplasma gondii* tachyzoites rhoptries: further insights into the role of cholesterol. *Biochem J* 2008;415:87–96.
- [14] Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* 2007;56:16–23.
- [15] Ye D, Hoekstra M, Out R, Meurs I, Kruijt JK, Hildebrand RB, et al. Hepatic cell-specific ABC transporter profiling identifies putative novel candidates for lipid homeostasis in mice. *Atherosclerosis* 2008;196:650–658.
- [16] Mencin A, Kluwe J, Schwabe RF. TLRs as targets in chronic liver diseases. *Gut* 2009;58:704–720.
- [17] Miura K, Kodama Y, Inokuchi S, Schnabl B, Aoyama T, Ohnishi H, et al. TLR9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. *Gastroenterology* 2010;139:323–334, e7.
- [18] Prieur X, Roszer T, Ricote M. Lipotoxicity in macrophages: evidence from diseases associated with the metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta* 2011;1801:327–337.
- [19] Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* 2008;118:2992–3002.
- [20] Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver

- damage and fibrosis in obese mice with NASH. *Hepatology* 2007;45:1366–1374.
- [21] Holland WL, Summers SA. Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocr Rev* 2008;29:381–402.
- [22] Nenseter MS, Gudmundsen O, Roos N, Maelandsmo G, Drevon CA, Berg T. Role of liver endothelial and Kupffer cells in clearing low density lipoprotein from blood in hypercholesterolemic rabbits. *J Lipid Res* 1992;33:867–877.
- [23] Otagawa K, Kinoshita K, Fujii H, Sakabe M, Shiga R, Nakatani K, et al. Erythrophagocytosis by liver macrophages (Kupffer cells) promotes oxidative stress, inflammation, and fibrosis in a rabbit model of steatohepatitis. *Am J Pathol* 2007;170:967–980.
- [24] Wouters K, van Gorp PJ, Bieghs V, Gijbels MJ, Duimel H, Lutjohann D, et al. Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of NASH. *Hepatology* 2008;48:474–486.
- [25] Kremer M, Thomas E, Milton RJ, Perry AW, van Rooijen N, Wheeler MD, et al. Kupffer cell and interleukin-12-dependent loss of NKT cells in hepatosteatosis. *Hepatology* 2010;51:130–141.
- [26] Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005;5:953–964.
- [27] Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:958–969.
- [28] Schneider JG, Yang Z, Chakravarthy MV, Lodhi JJ, Wei X, Turk J, et al. Macrophage fatty-acid synthase deficiency decreases diet-induced atherosclerosis. *J Biol Chem* 2010;285:23398–23409.
- [29] Koliwad SK, Streeper RS, Monetti M, Cornelissen I, Chan L, Terayama K, et al. DGAT1-dependent triacylglycerol storage by macrophages protects mice from diet-induced insulin resistance and inflammation. *J Clin Invest* 2010;120:756–767.
- [30] Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:2557–2562.
- [31] Rader DJ, Pure E. Lipoproteins, macrophage function, and atherosclerosis: beyond the foam cell? *Cell Metab* 2005;1:223–230.
- [32] Marcel YL, Ouimet M, Wang MD. Regulation of cholesterol efflux from macrophages. *Curr Opin Lipidol* 2008;19:455–461.
- [33] Yetukuri L, Katajamaa M, Medina-Gomez G, Seppanen-Laakso T, Vidal-Puig A, Oresic M. Bioinformatics strategies for lipidomics analysis: characterization of obesity related hepatic steatosis. *BMC Syst Biol* 2007;1:12.
- [34] Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 2007;25:297–336.
- [35] Li Z, Soloski MJ, Diehl AM. Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with NAFLD. *Hepatology* 2005;42:880–885.
- [36] Barral P, Polzella P, Bruckbauer A, van Rooijen N, Besra GS, Cerundolo V, et al. CD169(+) macrophages present lipid antigens to mediate early activation of iNKT cells in lymph nodes. *Nat Immunol* 2010;11:303–312.
- [37] Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A, Vats D, Morel CR, Goforth MH, et al. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 2008;7:496–507.



## Supplementary figures

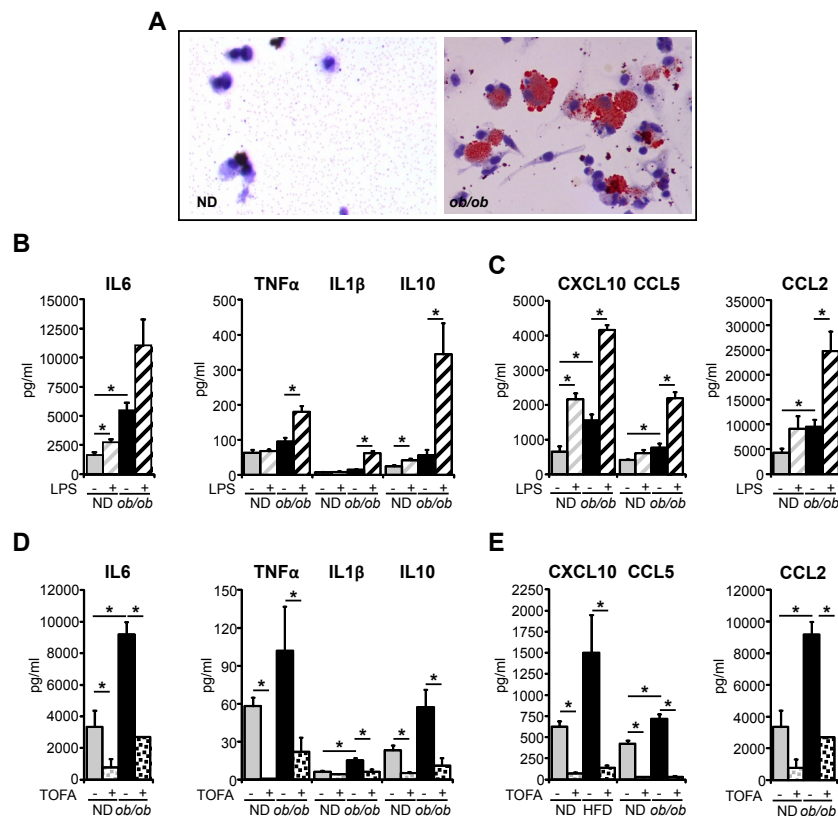
### Supplemental figure 1



#### Supplementary Fig.1. Quantification of KCs and hepatocytes by immunohistochemistry

(A) Immunostaining of F4/80 positive cells in the livers from ND (top) and HFD (bottom) mice. Peroxydation revelation shows KCs as brown cells. (B) KCs and hepatocytes were quantified by counting cells and data represent means of three fields/slide, 6 slides for ND mice and 7 slides for HFD mice.

### Supplemental figure 2



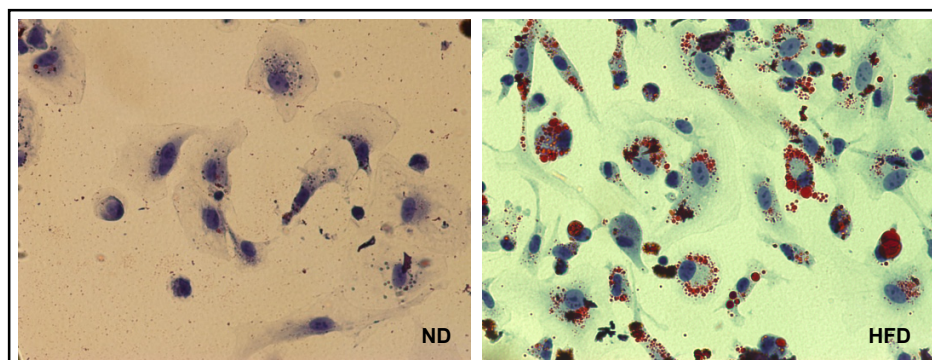
#### Supplementary Fig.2. Analysis of KCs from *ob/ob* mice

KCs from ND and *ob/ob* mice sacrificed at 11 weeks old, (A) stained with Oil Red and examined by light microscopy (400X). Left, ND mouse. Right, *ob/ob* mouse. (B and C) Cytokines and chemokines levels produced by KCs challenged or not with LPS (100 ng/ml). (D and E) Cytokines and chemokines levels produced by KCs challenged or not with TOFA (200 μM). Data represent the mean±SEM of 4 mice. Statistical analysis were performed using the Mann-Whitney; \*p<0.05.

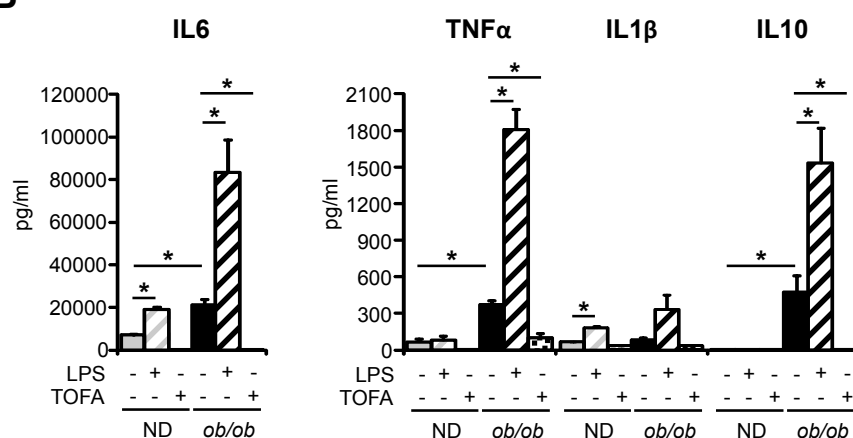


## Supplemental figure 3

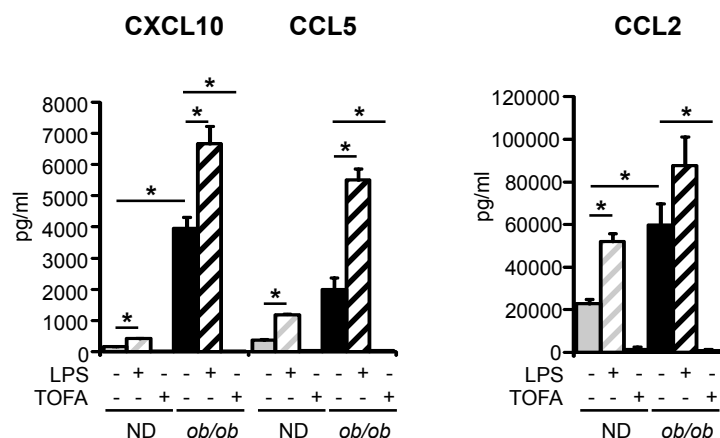
A



B



C

**Supplementary Fig.3. Analysis of ATMs**

ATMs, from ND or *ob/ob* mice sacrificed at 11 weeks old, (A) stained with Red Oil and examined by light microscopy (400X). Left, ND mouse. Right, *ob/ob* mouse. (B and C) Cytokines and chemokines levels produced by ATMs challenged or not with LPS (100 ng/ml) or with TOFA (200  $\mu$ M). Data represent the mean $\pm$ SEM of 3 ND mice and 4 *ob/ob* mice. Statistical analysis were performed using the Mann-Whitney test; \*p<0.05.

## Supplementary Materials

### *Diets*

Mice were fed either a normal diet (ND) or a high-fat diet (HFD) in which the energy content of fat was either 12% or 60% respectively (37% milk butter) containing saturated fatty acid (66%), mono-insaturated fatty acid (26.4%) and poly-insaturated fatty acid (7.7%) (Safe, France). Mice were fed the diets for 4, 8, 12 or 16 weeks. For *in vivo* LPS treatment, mice were ip injected with 5 mg/kg body weight of LPS from *E. coli* serotype O55:B5 endotoxin free (Alexis, Switzerland) or with a 0.09% saline solution 16hr before sacrifice.

### *Insulin-resistance*

Insulin-resistance was assessed by the oral glucose tolerance test (OGTT) and by calculating the homeostasis model assessment of insulin-resistance (HOMA): insulin (mU/ml) x fasting glucose (mmol/L)/22.4. For OGTT, the glucose load (2 g/kg) was given by gavage after 6hr of fasting and blood samples were taken from the tail vein at 0, 15, 30, 60, 90 and 120min after the gavage. Serum glucose concentrations were determined by the Accu-Chek® Performa (Roche, Switzerland) and the area under the glucose-time curve was calculated.

### *Tissue samples, plasma and supernatants analysis*

The serum was use for liver alanine aminotransferase (ALT) and triglyceride (TG) determinations (Olympus, AU400). Serum insulin, leptin, resistin, CCL2, IL6 and TNF $\alpha$  concentrations were determined by Milliplex kit (Millipore, MO). Liver samples were recovered for TG and RNA quantification or fixed in 4% formaldehyde, cut and stained with hematoxylin/eosin for histological examination. Cytokine and chemokine concentrations in cell supernatants were measured by Milliplex cytokine assay or by using ELISA (IL6 and CCL2) (R&D Systems, MN). Insulin-resistance was assessed as described in supplementay materials.

### *Isolation of NPC and KCs*

Mice were anesthetized and the livers were perfused inversely to the normal flux with PBS/EDTA (5 mM). After removing blood, livers were excised and homogenized with 0.05% collagenase IV (Sigma-Aldrich, MO) buffered with 0.1 M HEPES for 20 min at 37°C. Hepatocytes were removed by a short centrifugation at 50g. The non-parenchymateous cells (NPC) were filtered through a 70  $\mu$ m filter and resuspended in PBS 2% FCS prior to staining with mAbs and flow cytometry analysis.

For KCs isolation, NPC were resuspended with Optiprep 22% (Axis-Shield, Scotland), layered with HBSS/5mM EDTA and centrifuged at 900g at room temperature for 20min.

### *Isolation and culture of ATMs*

Epididymal adipose tissues were homogenized with collagenase IV as described for the liver. The homogenized solution was filtered through a 70  $\mu$ m filter and adipocytes were removed by a centrifugation 600g. The stroma vascular fraction was resuspended with Optiprep 22% as described for KC isolation. Cell viability was evaluated by trypan blue and was higher than 90%. The purity was assessed by F4/80 labelling and flow cytometry and was around 92%. ATMs ( $10^6$  cells) were plated in RPMI, 10% FCS and 1% penicillin/streptomycin for 24hr and then stimulated with 100 ng/mL LPS from *E. coli* serotype O55:B5 endotoxin free or not for 24 hr. For TOFA exposure, ATMs were treated with 200  $\mu$ M TOFA for 24hr. ATMs culture supernatants were stored frozen.

### *Red Oil staining and electon microscopy*

After 24hr of plating, KCs were fixed with 10% paraformaldehyde and stained in Red Oil solution (Sigma-Aldrich, MO). Nuclei were stained with hematoxylin (Merck, Germany). For transmission electron microscopy, KCs were fixed for 1hr with 3% glutaraldehyde, washed and post-fixed in 1% osmium tetroxide. Samples were dehydrated and embedded in epoxy resin. Sections (80 nm) were cut with an ultramicrotome (Reichert Ultracut S, Reichert Technologies, NY) and observed with a transmission electron



microscope (JEOL 1011, Japan) equipped with a GATAN digital camera (Germany).

#### *Immunostaining*

Immunohistochemical staining for F4/80 was performed on 4 µm sections of paraffin-embedded livers from ND and HFD mice. The paraffin was removed and the sections were rehydrated. Antigens were unmasked and endogeneous biotin was blocked with Biotin Blocking System (Dako, France). Sections were then incubated with a mAb against F4/80 (Serotec, Germany) at a concentration of 0.5 µg/ml, washed and incubated with a biotinylated secondary antibody (Becton biosciences, France) and then with a streptavidin-horseradish peroxidase complex (LSAB kit, Dako). Sections were then counterstained with hematoxylin. Images were obtained on a Leica DMLB microscope equipped with standard optic objectives, at the indicated magnification, and were digitalized directly with a Sony 3CCD color video camera.

#### *TaqMan low-density array analysis (TLDA)*

The concentration of each RNA sample was determined by  $A_{260}$  measurement and their integrities were determined using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). We produced cDNAs from RNA (1 µg) using the High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix and then mixed it with the TaqMan Universal PCR Master Mix. TLDA were performed in an ABI Prism 7900 HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using expression of the housekeeping gene GAPDH and 18S rRNA to correct for total mRNA. The relative signal-per-cell was quantified by setting a threshold within the logarithmic phase of the PCR and determining the cycle number at which the fluorescence signal reached the threshold ( $C_t$ ). The  $C_t$  for each target gene was subtracted from the  $C_t$  for the control genes. The relative amount was calculated as  $2^{-\Delta C_t} \times 10^2$ .

**Activation of Kupffer cells is associated with a specific dysbiosis  
induced by fructose or high fat diet in mice**

**Gladys Ferrere**, Anne Leroux, Laura Wrzosek, Virginie Puchois, Françoise Gaudin,  
Dragos Ciocan, Marie-Laure Renoud, Sylvie Naveau, Gabriel Perlemuter,  
Anne-Marie Cassard.

*En revision à PLoSOne*



# Activation of Kupffer cells is associated with a specific dysbiosis induced by fructose or high fat diet in mice

**Gladys Ferrere**<sup>1,2</sup>, Anne Leroux<sup>1,2</sup>, Laura Wrzosek<sup>1,2</sup>, Virginie Puchois<sup>1,2</sup>, Françoise Gaudin<sup>1,3</sup>, Dragos Ciocan<sup>1,2,4</sup>, Marie-Laure Renoud<sup>1,2</sup>, Sylvie Naveau<sup>1,2,4</sup>, Gabriel Perlemuter<sup>1,2,4</sup>, Anne-Marie Cassard<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>UMR996 - Inflammation, Chemokines and Immunopathology -, Inserm, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92140, Clamart, France.

<sup>2</sup>Univ Paris-Sud, DHU Hepatinov, Labex LERMIT, Clamart, 92140, France;

<sup>3</sup>IPSIT, IFR141, Clamart, 92140, France.

<sup>4</sup>AP-HP, Hôpital Antoine Bécère, Service d'hépatogastroentérologie, Clamart, 92140, France.

## ABSTRACT

The increase consumption of fructose in diet is associated with liver inflammation. As a specific fructan substrate, fructose may modify the gut microbiota which is involved in obesity-induced liver disease. Here, we aimed to assess whether fructose-induced liver damage was associated with a specific dysbiosis, especially in mice fed a high fat diet (HFD). To this end, four groups of mice were fed with normal and HFD added or not with fructose. Body weight and glucose sensitivity, liver inflammation, dysbiosis and the phenotype of Kupffer cells were determined after 16 weeks of diet. Food intake was increased in the two groups of mice fed with the HFD. Mice fed with HFD and fructose showed a higher infiltration of lymphocytes into the liver and a lower inflammatory profile of Kupffer cells than mice fed with the HFD without fructose. The dysbiosis associated with diets showed that fructose specifically prevented the decrease of Mouse intestinal bacteria in HFD fed mice and increased *Erysipelotrichi* in mice fed with fructose, independently of the amount of fat. In conclusion, fructose, used as a sweetener, induced a dysbiosis which is different in presence of fat in the diet. Consequently, the activation of Kupffer cells involved in mice model of HFD-induced liver inflammation was not observed in a HFD/fructose combined diet. These data highlight that the complexity of diet composition could highly impact

the development of liver lesions during obesity. Specific dysbiosis associated with the diet could explain that the progression of liver damage are different.

**Keywords** : NAFLD, Kupffer cells, microbiota, obesity, inflammation.

Received July 2015, revision in December 2015.

\*Corresponding authors :

address : INSERM UMR\_S996 32, rue des Carnets, 92140 Clamart, France.

E-mail : cassard.doucier@u-psud.fr (Dr. CASSARD)

## List of abbreviations

NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease, NASH: non-alcoholic steatohepatitis, NKT: natural killer T cell, KCs: kupffer cells, ND: normal diet, HFD: high fat diet, OGTT: oral glucose tolerance test, TG: triglycerides, ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, FFA: free fatty acids, HDL: high density lipoprotein, ALP: alkaline phosphatase, NPCs: non parenchymateous cells, CD: cluster of differentiation, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, FISH-FCM: fluorescent in situ hybridization combined with flow cytometry, PCA: principal component analysis, ND/F: normal diet with fructose, HFD/F: high fat diet with fructose, AT: adipose tissue, ACC: acetyl-CoA-carboxylase, FAS: fatty acid synthase, PPAR $\gamma$ : peroxysome proliferator activated receptor  $\gamma$ , SREBP-1c: sterol regulatory element binding protein 1c, ChREBPs: carbohydrate-responsive element-binding proteins, TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$ , IL6: interleukin 6, CCL2: C-C motif chemokine ligand 2, CCR2: C-C motif chemokine receptor 2, MHC: major histocompatibility complex, NOS: nitric oxid synthase, Arg: arginase, MRC1: mannose receptor 1, CPT1: carnitine palmitoyl transferase 1, TLR4: Toll-like receptor 4.

## INTRODUCTION

Non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is associated with obesity, insulin resistance, diabetes, hypertriglyceridemia and arterial hypertension in the metabolic syndrome (1). With the increasing incidence of obesity, NAFLD becomes probably the most common cause of chronic liver disease in Western countries. NAFLD can progress from steatosis to steatohepatitis (NASH, non-alcoholic steatohepatitis), fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (2). NASH is characterized by steatosis associated with liver inflammation and liver immune dysregulation. Recruitment of inflammatory cells into the liver and their subsequent activation are the key steps in the progression of liver disease. NAFLD is associated with altered hepatic lymphocyte subsets (3) including reduced numbers of hepatic Natural Killer T (NKT), lymphocytes and T regulatory lymphocytes. Moreover, resident macrophages of the liver, Kupffer cells (KCs) play a key role in the onset of NASH. We have recently showed that KCs of obese mice are loaded with lipid droplets named “fat-laden” KCs. This accumulation of lipids orients KCs towards a pro-inflammatory phenotype and participate to the development of an abnormal immune response in the liver (4).

Modifications of diet habits in western countries show an increase of fructose intake (5). Indeed, daily fructose intake increased from 15g before 1900 until an estimated consumption of 73g in american adolescents in 1994. This increase is the reflect not only of a higher fruit juice intake but also of a more commonly substitution of sucrose by high fructose corn syrup in soda. Then, the percentage of fructose in the diet was increased from 4% until 12% of total calories (6). We therefore aimed to study the involvement of fructose on the development of inflammatory liver lesions in mice fed a high fat diet. Fructose could be a specific substract for gut bacteria, we assessed dysbiosis caused by fructose enrichment specifically associated with high fat diet consumption.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Animal trials and diets.** Mice were treated in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council,

1996).

The evaluation of installation was performed by the departement of veterinarian service « des Hauts-de-Seine » and the agreement number is C92-02-301. The relevant Institutional Animal care comittee that approved this work is the “Consortium des Animalerie Paris Sud » (CAPSud) registered with the comittee “Comité d’Ethique en Expérimentation Animale” under the number 26 (CEE26). This work is anterior to the obligative ethic comittee but the technics, diet and traitement used in this work are currently used and were validated by the ethic comittee with the number 2014\_009.C57BL/6J mice were purchased (Janvier, Le Genest, France) and maintained under a 12h light/dark schedule, with food and water *ad libitum* and treated in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 1996). Mice were fed either a normal diet (ND) or a high-fat diet (HFD) in which the energy content of fat was either 12% or 60% respectively. The HFD diet was performed with lard (34%) and contained saturated fatty acid (8.3%), mono-insaturated fatty acid (4.5%) and poly-insaturated fatty acid (5.8%), (Ssniff, Soest, Germany). Animals had free access to either water or water containing 20% fructose (w:v). Eight mice per group were fed the diets for 16 weeks. The caloric intake was measured by the diet consumption and the water containing fructose consumption. The energy content of normal diet (genestil 1314, Royaucourt, France) was 2988 kCal/kg and the energy content of the high fat diet (Ssniff D12492) was 5736 kCal/kg. The energy content of fructose (21%) was 84 kCal/L.

**Glucose tolerance.** Oral glucose tolerance test (OGTT) were performed as follow: a glucose load (2 g/kg) was given by gavage after 6h of fasting and blood samples were taken from the tail vein at 0, 15, 30, 60, 90 and 120 min after the gavage. Serum glucose concentrations were determined by the Accu-Chek® Performa (Roche, Risch, Switzerland) and the area under the glucose–time curve was calculated.

**Tissues ans samples.** Mice were anesthetised with ketamine (Imalgène, 200mg/kg) and Rompun (Xylasine, 20mg/kg) diluted in NaCl 0.9% and blood samples were collected in EDTA coated tubes. Then, the livers were perfused inversely to the normal flux with PBS/EDTA (5mM). After removing

Ferrere G. et al

blood, livers were excised, weighed and either fixed in buffered formaldehyde or snap-frozen in liquid nitrogen for triglycerides (TGs) and RNA extractions. All samples were stored at -80°C until use. The serum was used for alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) (Olympus AU400, Sydney, Australia), triglycerides, free fatty acids (FFA), HDL-cholesterol and Alkaline phosphatase (ALP) quantification by using a AU400 chemistry analyzer. One sample of blood was extemporaneously used to perform monocytes labelling.

**Isolation and labelling of NPC, KCs.** After removing blood, livers were excised and homogenized with 0.05% collagenase IV (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri) buffered with 0.1 M HEPES for 20 min at 37°C. Hepatocytes were removed by a short centrifugation at 50g. The non-parenchymatous cells (NPCs) were filtered through a 70 µm filter and resuspended in PBS 2% Fetal Cow Serum prior to staining with monoclonal antibodies and flow cytometry analysis. For KCs enrichment, NPCs were resuspended with Optiprep 22% (Axis-Shield, Scotland), layered with HBSS/ EDTA (5mM) and centrifuged at 900g at room temperature for 20 min. Among NPCs, lymphocytes CD45<sup>+</sup> count was quantified by the labeling of CD45 cell surface antigen (V500-conjugated rat anti-CD45 monoclonal antibody 30-F11, Becton Dickinson, New Jersey). Macrophages were stained with a rat anti-F4/80 antibody (CI:A3-1, AbD Serotec, Kidlington, UK) and a rat anti-MHCII antibody (M5/114.15.2, Ebiosciences, San Diego, USA), a rat anti-CD40 (3\_23) and anti-CD86 (GL1) monoclonal antibodies, an armenian hamster anti-CD80 (16-10A1) and anti-CD11c (HL3) mononuclear antibodies (Becton Dickinson, New Jersey, USA). Results were analyzed with a Fortessa LSR-II machine (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, New Jersey, USA).

#### **Measurement of liver triglycerides and glycogen.**

Portions of frozen liver from mice were homogenized in chloroform-methanol (2:1) in order to extract total lipids and TGs were separated by thin layer chromatography. TGs were extracted from the silica plate with acetone, measured with a colorimetric diagnostic kit (Triglycerides FS; Diasys, Holzheim, Germany) and

expressed in mg of TGs per mg of liver. To quantify liver glycogen, we used a glycogen assay kit (MAK016, Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Briefly, 10 mg of liver is homogenized in 100 µL of water at 4°C and boiled for 5 minutes to inactivate enzymes. Samples were centrifuged at 13,000g for 5 min. 50 µL of samples were incubated in the Master mix as described by the purchaser. The absorbance was measured at 570 nm. Glycogen measurement was performed on mice after 12 weeks of diet, since livers of mice after 16 weeks of diet were used for other experiments.

**Liver histology.** Liver were fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde and then embedded in paraffin. Paraffin sections (4 µm) were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E). Images were obtained by using a NanoZoomer Digital Pathology system (x20), objective lens numerical aperture 0.75 (Hamamatsu Photonic).

**Reverse transcription of RNA.** Mice livers were disrupted in Qiazol solution. Total RNA was extracted using a Qiagen RNeasy Lipid tissue minikit (Qiagen, Toronto, Canada). The RIN (RNA integrity number) was determined with the Agilent bioanalyzer 2100 system with the RNA 6000 Nano Labchip kit (Agilent Technologies, Santa Clara, Californie). Samples with a RIN inferior to 8 were eliminated. For cDNA synthesis, 1 µg of each total RNA sample was reverse transcribed. After their denaturation (5 min at 70°C), a 12 µL mix containing 1 µg of RNA, 1 µL of M-MuLV reverse transcriptase, 4 µL of 5x Buffer, 2 µL of 0.1 M dithiothreitol, and 1 µL of Protector RNase Inhibitor (40 U/µL), 10 mM dNTP Mix (Invitrogen, Carlsbad, Canada) and random hexamers (Roche Diagnostics, Meylan, France), was prepared for each sample. Samples were then heated at 65°C for 5 min and cooled on ice. The reaction conditions were 42°C during 1h, 5 min at 94°C.

#### **Gene expression analysis by quantitative PCR.**

Real-time qPCR was performed in a Light Cycler 480 (Roche Diagnostics, Risch, Swiss) using the LC FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics). Amplification was initiated with an enzyme activation step at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles consisting of 20s of denaturation at 95°C, 15s of annealing at the

temperature appropriate for each primer, and 10s of elongation at 72°C. Primers used to amplify cDNA are listed in table 1. Data were analyzed using LC 480 Software (Roche Diagnostics). The relative genes expression were normalized to the GAPDH reference gene.

**Table 1 : Primers used for q-PCR reactions**

Name	Forward	Reverse
GAPDH	5'-GTG-GAC-CTC-ATG-GCC-TAC-AT-3'	5'-TGT-GAG-GGA-GAT-GCT-CAG-TG-3'
ACC	Ref Qiagen : QT00258419	
FAS	5'-TTC-CAA-GAC-GAA-AAT-GAT-GC-3'	5'-AAT-TGT-GGG-ATC-AGG-AGA-GC-3'
CPT1	5'-TCT-TGC-AGT-CGA-CTC-ACC-TT-3'	5'-TCC-ACA-GGA-CAC-ATA-GTC-AGG-3'
PPAR-g	5'-GCA-GCT-ACT-GCA-TGT-GAT-CAA-GA-3'	5'-GTC-AGC-GGG-TGG-GAC-TTT-C-3'
ChREBP	5'-ATG-ACC-CCT-CAC-TCA-GGG-AAT-A-3'	5'-GAT-CCA-AGG-GTC-CAG-AGC-AG-3'
SREBP-1c	5'-AAC-GTC-ACT-TCC-AGC-TAG-AC-3'	5'-CCA-CTA-AGG-TGC-CTA-CAG-AGC-3'
TNFA	5'-TCT-CAT-CAG-TTC-TAT-GGC-CC-3'	5'-GGG-AGT-AGA-CAA-GGT-ACA-AC-3'
IL6	5'-GTT-CTC-TGG-GAA-ATC-TTG-GA-3'	5'-TGT-ACT-CCA-GGT-AGC-TAT-GG-3'
TGFb	5'-GCA-ACA-TGT-GGA-CTC-TTA-CCA-GAA-3'	5'-GAC-GTC-AAA-AGA-CAG-CCA-CTC-A-3'
F4/80	5'-TCT-GGG-GAG-CTT-ACG-ATG-GA-3'	5'-GAA-TCC-CGC-AAT-GAT-GGC-AC-3'
CD68	5'-CTT-CCC-ACA-GGC-AGC-ACA-G-3'	5'-AAT-GAT-GAG-AGG-CAG-CAA-GAG-G-3'
CCL2	5'-AGG-TCC-CTG-TCA-TGC-TTC-TG-3'	5'-TCT-GGA-CCC-ATT-CCT-TCT-TG-3'
CCR 2	Ref Qiagen : QT02276813	
Nos2	5'-CCA-AGC-CCT-CAC-CTA-CTT-CC-3'	5'-CTC-TGA-GGG-CTG-ACA-CAA-GG-3'
Arg 1	5'-CTC-CAA-GCC-AAA-GTC-CTT-AGA-G-3'	5'-AGG-AGC-TGT-CAT-TAG-GGA-CAT-C-3'
MRC1	5'-GGA-CGA-GCA-GGT-GCA-GTT-3'	5'-CAA-CAC-ATC-CCG-CCT-TTC-3'

## Feces collection and analysis of the gut microbiota.

Fresh fecal samples from mice fed the different diets were collected and fixed one day before mice were euthanized. Fluorescent in Situ Hybridization combined with Flow Cytometry (FISH-FCM) analysis was performed. Fixation and permeabilization of samples were carried out as described previously (7). Permeabilized cells were hybridized in the dark for 16 h at 37°C in 50 µl of hybridization buffer (900 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.2; 0.01% SDS; 15% formamide; and 4 ng µl<sup>-1</sup> of fluorescent probe) in a 96-well microtiter plate. The 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes targeting nine bacterial groups used in this study are listed in Table 2, with 4 control probes, Eub338 which is specific for the domain Bacteria and NonEub338 which is the complement of Eub338 and is used as a negative control to account for non-specific binding and background fluorescence. They were covalently linked with fluorescein isothiocyanate (FITC) or indodicarbocyanin (Cy5) at the 5'-end (Thermo Fischer Scientific GmbH, Ulm, Germany). All the following steps were performed in the dark, a volume of 150 µl of hybridization solution was added to each well and cells were pelleted at 4000g for 15 min. Non-specific binding of the probe was removed by incubating the bacterial cell suspension at 37°C for 20 min in a washing solution (64 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA,

0.01% SDS). Cells were pelleted and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2). Aliquots of 100 µl were added to 0.5 ml of FACS Flow (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey) for data acquisition by flow cytometry. Cell enumeration was performed by combining one group Cy5-probe with the Eub338 FITC-probe in one hybridization tube. Results were expressed as cells hybridizing with group-Cy5 probe as a proportion of the total bacteria hybridizing with the general Eub338 FITC-probe. To quantify bacterial DNA, optimized buffers and enzymes were used to digest the liver and to recover DNA. Bacterial DNA was quantified by using universal primers for Eubacteria : ACT-CCT-ACG-GGA-GGC-AGC-AGT 3' (forward) and 5' ATT-ACC-GCG-GCT-GCT-GGC 3 (reverse).

**Table 2. Nomenclature, sequences and targets of probes used for fluorescent in situ hybridization.**

Probe name	Sequence (5' - 3')	Target	Fluorochrome
NON EUB 338	ACATCCTACGGGAGGC	none	5'FITC
NON EUB 338	ACATCCTACGGGAGGC	none	5'CY5
EUB 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	domain Bacteria	5'FITC
EUB 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	domain Bacteria	5'CY5
Bif164	CATCCGGCATTACCACCC	<i>Bifidobacterium</i> genus	5'CY5
Bac303	CCAATGTGGGGACCTT	<i>Bacteroides-Prevotella</i> group	5'CY5
Lab158	GGTATTAGCAYCTGTTTCCA	<i>Lactobacillus-Lactococcus-Enterococcus</i> group	5'CY5
Clep 866	GGT GGA TWA CTT ATT GTG Competitor 1 GGT GGA AWA CTT ATT GTG Competitor 2 GGT GGA TWAV CTT ATT GCG	<i>Clostridium leptum</i> subgroup	5'CY5
Ato 291	GGTCGGTCTCTCAACCC	<i>Atopobium</i> cluster and <i>Coriobacterium</i> group	5'CY5
Enter 1432	CTTTTGCAACCACT	Enterobacteria	5'CY5
Erec 482	GCTTCTTAGTCAGGTACCG	<i>Clostridium coccoides</i> group	5'CY5
Ecy1 387	CGCGGCATTGCTCGTTCA	<i>Erysipelotrichi</i>	5'CY5
MIB 661	GCATTCCGCATCTTCTC	Mouse Intestinal Bacteria	5'CY5

\*Y = C/T and W = A/T

**Statistical analysis.** Results are represented as mean±SEM. Statistical analysis were performed by Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests (Graphpad Prism, Graphpad Software Inc, La Jolla, California); p<0,05 was considered statistically significant. The NCSS9 software (Kaysville, Utah) was used for principal component analysis (PCA).

## RESULTS

### Fructose involvement in body weight and glucose sensitivity

After 8 weeks of diet, high fat diet (HFD) fed mice showed a significant increase in body weight compared to mice fed with a normal diet (ND) or a ND diet associated with fructose (ND/F) (**Fig 1A**).

This body weight increase was associated with an increase of the glucose sensitivity in mice fed with a ND diet compared to mice fed with a HFD diet, independently of fructose (**Fig 1B and C**). After 12 weeks of diet, the body weight increased in the HFD and the HFD/F compared to ND and ND/F fed mice groups (**Fig 1A**). After 16 weeks of diet, the body weight of mice were not modified in the ND/F fed mice group compared to the ND fed mice group and the caloric intake was similar in the 2 groups (**Fig 1A and F**).

Although the fructose participated in a large part of the calories number/day in the ND/F fed mice group (53%), the fructose consumption did not modify the glucose sensitivity in mice (**Fig 1D and E**). HFD/F fed mice group showed a significant weight gain compared to the HFD fed mice group. This difference was associated with a significant increase of the caloric intake of mice fed with the HFD compared to the HFD/F diet (**Fig 1F**).

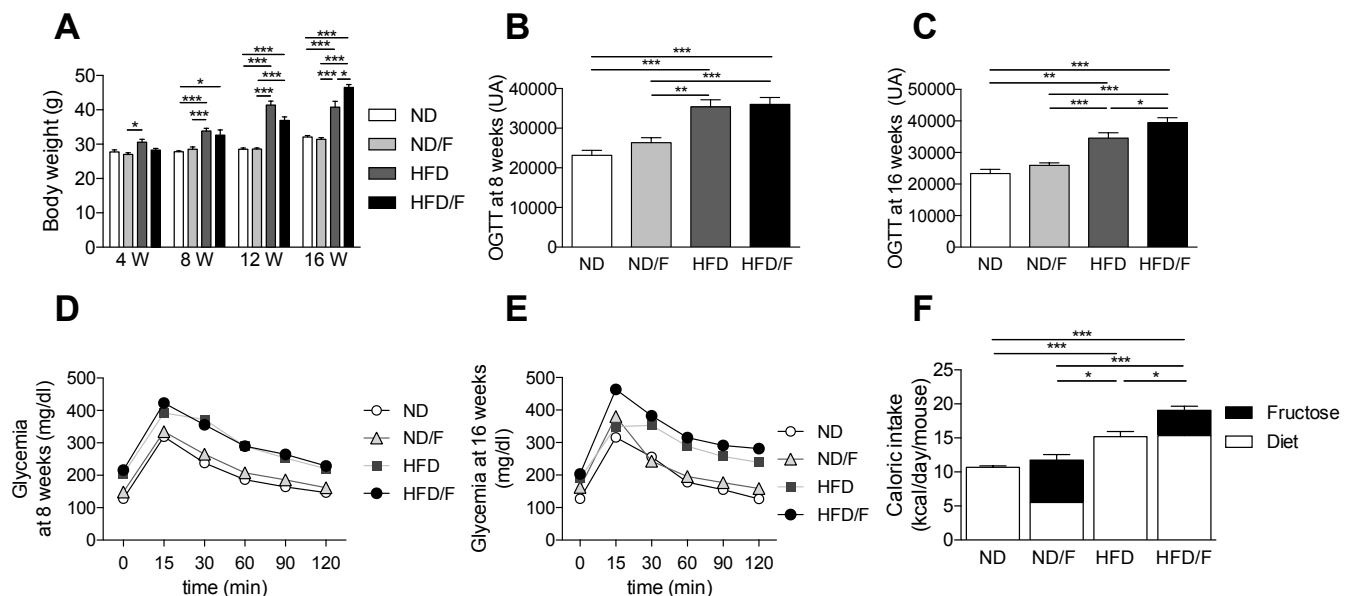
Similarly, the glucose sensitivity of the group of mice fed with the HFD/F was significantly higher compared to the HFD fed mice group (**Fig 1D and E**). The fructose consumption in the HFD/F fed mice group participated in a low part of the calories number/day compared to the ND/F fed mice group (19,5% and 53% of the calories intake, respectively) but induced a higher caloric intake and a worsening of the glucose sensitivity (**Fig 1F**).

### Liver lesions associated with diet composition

After 16 weeks of diet, mice were euthanized and liver lesions were assessed. Steatosis as shown by histology and TGs quantification was significantly higher in the HFD/F group of mice (**Fig 2A and B**) compared to the other groups of mice.

Conversely, fructose associated with the ND diet was not able to induce a higher steatosis compared to the ND group of mice (**Fig 2B**). However, if body weight gain was similar between the ND and the ND/F groups of mice, the epididymal adipose tissue (AT) weight was slightly increased in the ND/F group of mice (**Fig 2C**).

Conversely, the epididymal AT was similar in the HFD and the HFD/F group of mice although a high caloric intake in the HFD/F group of mice.

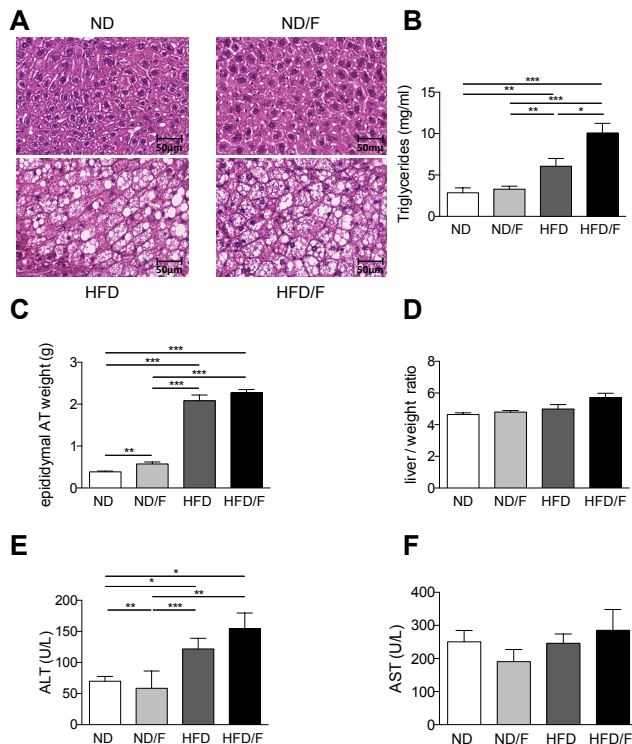


**Fig 1. Follow-up of mice after 4, 8, 12 and 16 weeks period of feeding with ND, ND/F, HFD and HFD/F diets.** Mice were fed with normal diet (ND), ND with fructose (ND/F), high fat diet (HFD) and HFD with fructose (HFD/F) diets during 4, 8, 12 and 16 weeks. (A) Evolution of mice weight. (B) Representative histograms of the area under the curve of the oral glucose tolerance test after 8 weeks of diet or (D) at 16 weeks of diet. (C) Curves of glycemia after an oral glucose tolerance test at 8 weeks of diet or (E) at 16 weeks of diet. (F) Caloric intake. Data represent the mean±SEM of 8 mice, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*p<0.001.



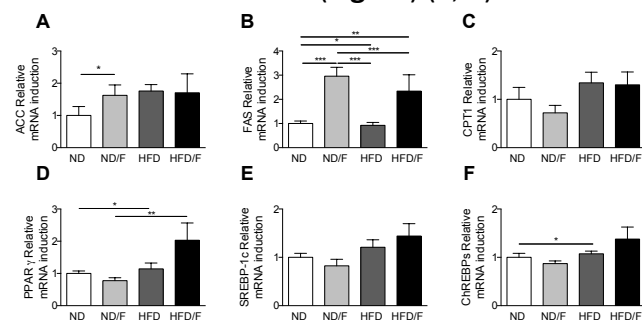
Ferrere G. et al

Hepatocellular injury induced an increase of ALT only in both groups of HFD fed mice independently of the fructose consumption compared to the ND fed mice groups (**Fig 2E**), AST level was not modified (**Fig 2F**).



**Figure 2: Analysis of hepatic phenotype and fat mass after 16 weeks of diet.** (A) Histological examination of liver tissue section stained with Hematoxylin-eosin (scale 50um). (B) Hepatic triglyceride content. (C) Fat mass of epididymal adipose tissue amount. (D) Liver / weight ratio. (E) Plasma ALT level. (F) Plasma AST level. Normal diet: ND; ND with fructose: ND/F; high fat diet: HFD; and HFD with fructose: HFD/F. Data represent the mean±SEM of 8 mice, \*, p<0.05, \*\*, p<0.01, \*\*\*p < 0.001.

The liver body / weight ratio were not modified by diets as often described in diet induced obesity in mice conversely to *ob/ob* mice or diet deficient in choline and methionine (**Fig 2D**) (8, 9).



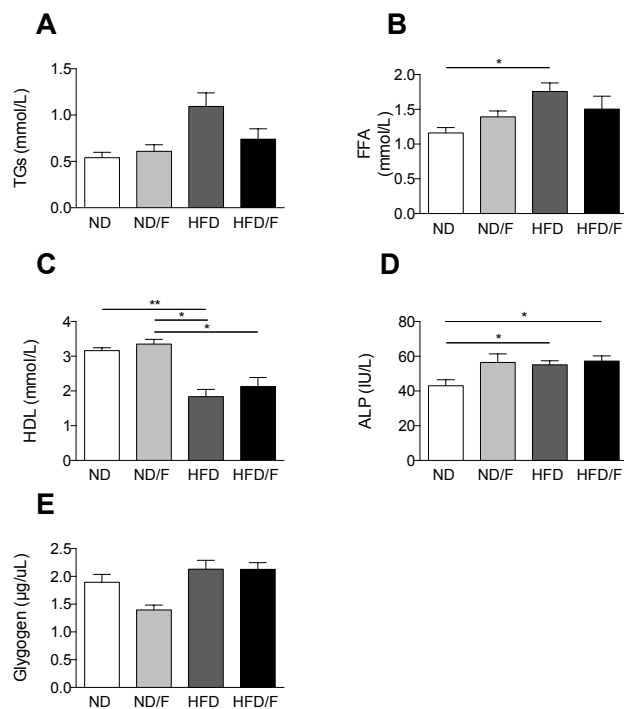
**Figure 4: Quantification of liver mRNA of genes involved in lipogenesis.** (A) Acetyl-CoA-carboxylase (ACC), (B) Fatty acid synthase (FAS), (C) Carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1), (D) Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ), (E) Sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) and (F) Carbohydrate-responsive element-binding protein. Normal diet: ND; ND with fructose: ND/F; high fat diet: HFD; and HFD with fructose HFD/F. Data represent the mean±SEM of 8 mice (Mann-Whitney, \*, p<0.05, \*\*, p<0.01, \*\*\*p < 0.001).

Plasma triglycerides were increased exclusively in the HFD fed mice, as the free fatty acids (Fig 3A and B), conversely to the liver triglycerides which were higher in the HFD/F fed mice (**Fig 2B**). HDL was decreased in both HFD group of mice (**Fig 3C**). Alkaline phosphatase was increased in all groups of mice compared to the control group (**Fig 3D**). As fructose could modify glycogen storage we quantified the liver glycogen. Surprisingly, the level of glycogen was not modified in mice whatever the diet (**Fig 3E**).

We assessed to the *de novo* lipogenesis by mRNA quantification of ACC (Acetyl-CoA-carboxylase) and FAS (Fatty acid synthase) enzymes. FAS showed a significant increase in mice fed with fructose and a tendency in mice fed with a HFD and a HFD/F diets (**Fig 4A and B**). However, mice fed with a HFD diet did not show a similar increase of FAS. We found an increase of lipogenesis in mice fed with fructose without an increase of TG in the liver. No modification of the CPT1 was observed (**Fig 4C**).

The quantification of mRNA expression for nuclear factors involved in lipogenesis regulation showed that PPAR $\gamma$  was specifically increased in mice fed with a HFD and a HFD/F diets (**Fig 4D**). No increase was observed for SREBP1c and a slight increase was found for ChREBPs in mice fed with a HFD diet (**Fig 4E and F**). These discrepancies were previously described in several papers (4, 10-12).

As ALT level is not strictly correlated with the severity of liver injury in NAFLD (4, 8), inflammation was also scored by quantification of intrahepatic lymphocytes. Fructose consumption associated with a HFD diet (HFD/F) induced a higher lymphocyte recruitment compared to a HFD diet (**Fig 5A**). Lymphocytes increased was characterized by higher levels of lymphocytes T CD4 $^{+}$  and NKT (**Fig 5B**). This inflammation was associated with the increase of mRNA expression of TNF $\alpha$  in the two HFD group of mice (**Fig 6A**) although IL6 mRNA expression was not different as previously shown in HFD mice (4). However, the F4/80, CD68 and CCL2 mRNA expression were significantly increase in the HFD fed group of mice compared to the HFD/F fed mice suggesting that KCs were differently activated (**Fig 6B**).



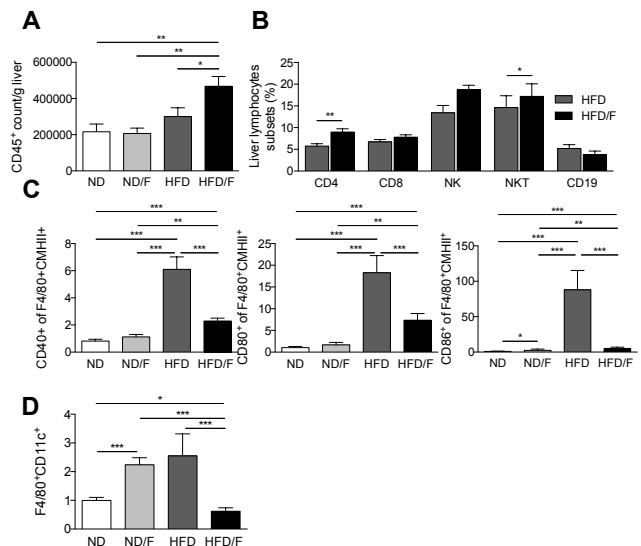
**Figure 3: Quantification of plasma parameters and liver glycogen.** Several parameters were quantified in plasma (A) Triglycerides, (B) Free fatty acid, (C) HDL, (D) Alkaline phosphatase (ALP). (E) Liver glycogen in mice after 12 weeks of diet. Normal diet: ND; ND with fructose: ND/F; high fat diet: HFD; and HFD with fructose: HFD/F. Data represent the mean±SEM of 8 mice (Mann-Whitney, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01).

CCR2 mRNA was increased similarly in HFD and HFD/F fed mice. As we previously demonstrated that KCs showed a proinflammatory phenotype in the liver of obese mice (4), we assessed their activated phenotype by flow cytometry. Conversely to the lymphocytes quantification, the up-regulation of co-activation molecules, CD40, CD86 or MHCII was significantly increased in KCs (F4/80 positive cells) of the HFD fed mice group (Fig 5C).

The mRNA expression of genes associated with a pro (NOS2) or an anti-inflammatory phenotype (Arginase and MRC1) were modified only in KCs of HFD fed mice (Fig 6C). Moreover, as described in

the white adipose tissue of obese mice, the percentage of KCs expressing the CD11c molecule was higher in the HFD fed group of mice but not in the HFD/F fed group of mice (13). The number of CD11c KCs was also surprisingly higher in the ND/F fed group of mice without any changes in their phenotype profiles assessed by flow cytometry (Fig

### A dysbiosis was associated with fructose

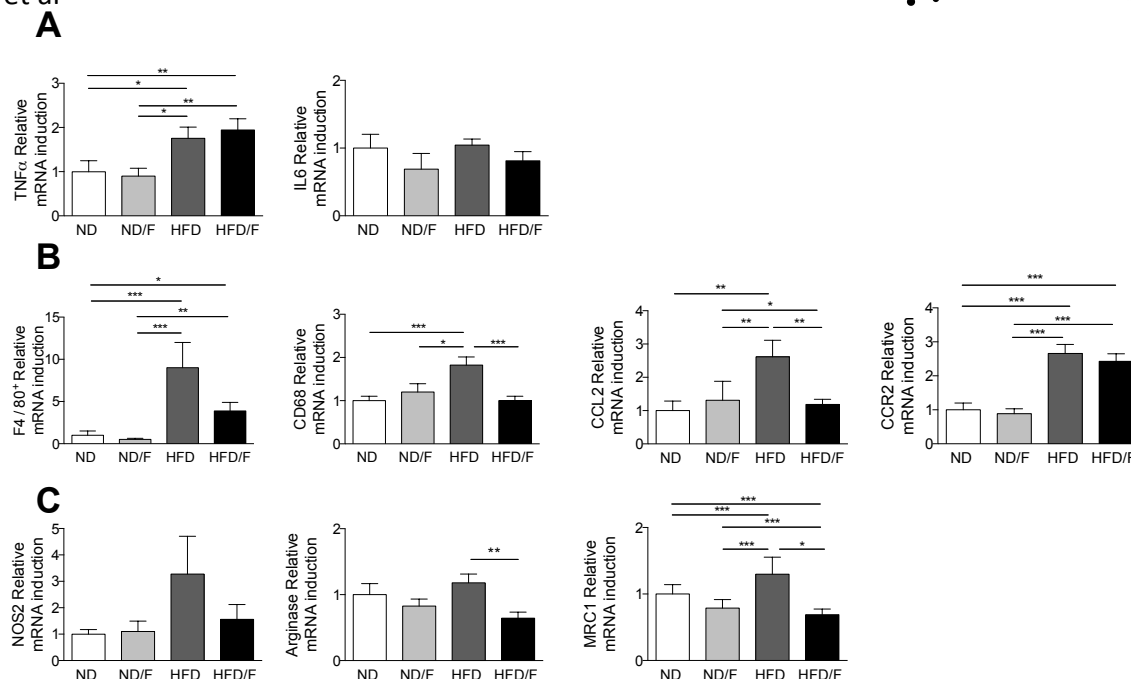


### consumption

As recently shown, KCs participate in the commensal clearance of blood commensal bacteria as known as the microbiota (14). To assess that the activation of KCs could be correlated to a specific microbiota we performed FISH-FCM to analyze dominant and sub-dominant bacterial populations. A set of 12 probes targeting bacterial 16S rRNA

**Figure 5: Quantification of inflammation and KC phenotype after 16 weeks of diet.** Quantification of liver lymphocytes subsets in the liver of mice by flow cytometry, (A) CD45<sup>+</sup>, (B) CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, NKT and NK cells. (C) Quantification of activated KCs phenotype by

were used to assess the relative proportion of intestinal bacterial phylogenetic groups (Table 2). 5C).



**Figure 6: Quantification of inflammation and KC phenotype after 16 weeks of diet.**

Hepatic mRNA level of genes involved in inflammation and in KC phenotype. mRNA levels were normalized to GAPDH expression and fold inductions were calculated. (A) TNF $\alpha$ , IL6. (B) F4/80, CD68, CCL2 and CCR2. (C) NOS2, Arginase and MRC1. Normal diet: ND; ND with fructose: ND/F; high fat diet: HFD; and HFD with fructose: HFD/F. Data represent the mean $\pm$ SEM of 8 mice (Mann-Whitney, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

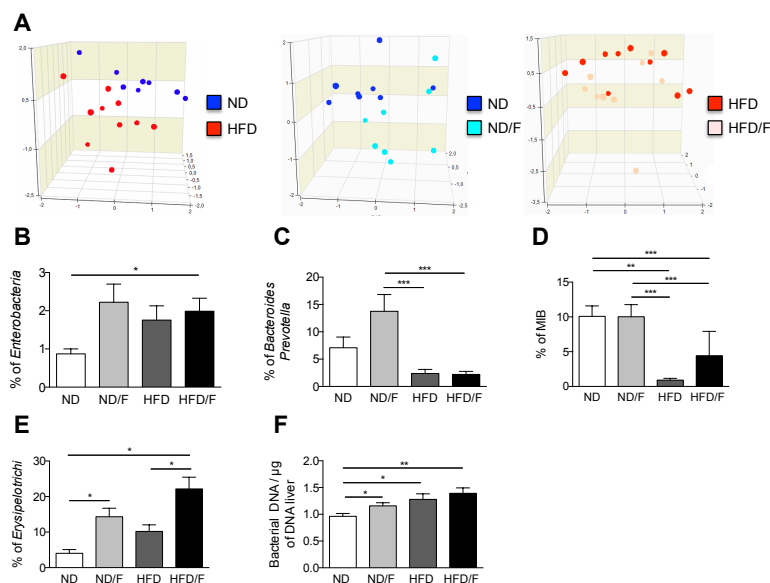
The composition of the faecal microbiota were similar in all groups of mice before the diet (data not shown). Principal component analysis (PCA) was used to examine the overall structure of the microbiota. Resulting ordination plots highlighted that dysbiosis were associated with the diet composition (Fig 7A). However, dysbiosis was clearly observed by addition of fructose to a ND diet or the addition of lipids to a ND diet. Indeed, the HFD consumption compared to the ND consumption was associated with a dysbiosis which clustered each group of mice ND versus HFD groups in accordance to previous data (15, 16). Similarly, the addition of fructose to a ND diet clustered mice in two separate groups. However, the addition of fructose to the HFD diet (HFD/F) showed that diversity of nutrients (high lipids and high carbohydrates) decrease the ability to cluster groups of mice by their gut microbiota (Fig 7A).

Among analysed bacteria, the group of *Clostridium coccoides*, *Clostridium leptum*, *Atopobium*, *Lactobacillus-Enterococcus* and *Bifidobacterium* were not significantly modified by diets (data not shown). Conversely, *Enterobacteria* were systematically increased by changes in the diet (Fig 7B). As previously shown *Bacteroides* genus was decreased by the HFD diet independently of

fructose consumption (Fig 7C). Conversely, the consumption of fructose with a normal diet induced a high increase of *Bacteroides*. *Erysipelotrichi* were increased by the fructose consumption independantly of the HFD diet (Fig 7D). Mouse Intestinal Bacteria (MIB) which were also detected in humans, were decreased in HFD and HFD/F fed group of mice (Fig 7E).

However, the fructose consumption with the HFD prevented the large decrease of the MIB percentage. To assess the disruption of the gut barrier, we quantified the bacterial DNA in the liver (Fig 7F).

We showed that bacterial DNA content of mice fed a HFD was significantly different from the DNA content of mice fed a ND. However, the DNA content was also increased in mice fed with the ND diet and fructose (ND/F). Although this is an indirect quantification of the gut barrier disruption, this result prove that the increase of bacterial DNA translocation in HFD mice could explain the higher activation of KCs. Then, the development of liver lesions was associated with an increase of bacterial DNA content but also with specific bacterial patterns.



**Figure 7: Dysbiosis induced by HFD and fructose diets after 16 weeks of diet.**

Analysis of gut bacterial communities by 16S rDNA analysis in feces from mice fed with different diets. (A) PCA representation of microbiota profile. Each point corresponds to a community from a single mouse fed with different diet. (B) Percentages of *Enterobacteria*. (C) Percentages of *Bacteroides/Prevotella*. (D) Percentages of Mouse intestinal Bacteria. (E) Percentages of *Erysipelotrichi*. (F) Quantification of liver bacterial DNA. Data represent the mean±SEM of 8 animals (Mann-Whitney, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*p < 0.001).

## DISCUSSION

Nutrients have an influence on the body and recently changes in food consumption induced the development of various pathologies including obesity-induced liver disease. To counteract the increasing high fat consumption and the excess of calories intake, industrialized food was designed to compensate high energy content by lowering sugar consumption. If non caloric artificial sweeteners were used for many years, the use of fructose as alternative sugar source was more recent. Recent studies showed that fructose promote increased food intake and contributed to impair insulin sensitivity (17) and was associated with the severity of NAFLD (18). However, the effects of fructose and the higher energy intake could be confounded especially in humans studies (19). To address the impact of fructose associated with a high fat diet, we induced obesity in mice and also addressed the impact of fructose alone. Fructose did not induce an increase of the amount of caloric intake per day. Actually, in mice fed a ND/F diet compared to mice fed a ND diet, food consumption was decreased whereas water consumption containing 20% of fructose was increased, leading to an absence of body weight gain. This fructose consumption was not sufficient to impair the glucose tolerance as previously described (11, 20). Conversely, mice fed a HFD with fructose showed an increase of ingested calories per day. In the HFD and HFD/F group of mice, steatosis was significantly increased. Expression of some genes

involved in lipid homeostasy, *de novo* lipogenesis and transcriptional factors showed that FAS and PPAR $\gamma$  were increased specifically in mice fed a HFD/F diet. Surprisingly, we found that *de novo* lipogenesis was increased in mice fed fructose whereas no TGs accumulation was found. Moreover, we did not found any significant increase of glycogen storage in mice fed with fructose after 12 weeks of diet. The increase of steatosis in both group of mice fed with a HFD diet was associated with differences in the onset of inflammation. Actually, we showed that the lymphocyte infiltration induced by the HFD/F diet was increased compared to the HFD fed mice group. Conversely, and surprisingly Kupffer cells which were activated in the HFD fed mice group were not activated in the HFD/F group. We have previously shown that an HFD diet induced not only lymphocytes recruitment but also KCs modifications (4). KCs as monocytes/macrophages are a heterogenous population which release a high diversity of cytokines and chemokines, express numerous cell surface markers and transcriptional profiles. These cells have been classified either into pro-inflammatory, M1 or anti-inflammatory, M2 macrophages. However, this simple dichotomous nomenclature does not reflect the diversity of macrophages in a tissue (21-23). KCs from HFD mice accumulated lipids which were responsible for their inflammatory phenotype. In the present study we showed that fructose differently induced the KCs phenotype. Transcriptional profile was clearly modified in KCs

of HFD fed mice compared to mice fed a HFD and fructose diet. As an antigen presenting cell, KCs could process antigens inducing a higher expression of surface co-stimulatory molecules. The analysis by flow cytometry of co-stimulatory molecules CD80, CD86 and CD40, also showed a specific increase in HFD fed mice. Indeed, HFD/F diet induced a higher TG accumulation in the liver, that was associated with a lower activation of KCs compared to mice fed a HFD diet. However, we observed a higher content of lymphocytes in the liver of those mice and especially high percentages of CD4<sup>+</sup> lymphocytes and NKT cells. NKT cells are known for their potent role in immune regulation, especially in the liver where the NKT content is high in comparison to the blood NKT content. In liver disease, a decrease in NKT percentage was described in *ob/ob* mice and conversely increased in alcohol-induced liver disease (24, 25). In *ob/ob* mice the low content of NKT in liver was associated with an excessive production of pro-inflammatory cytokines promoting inflammation (24). Mice fed a HFD/F diet showed a lower activation of KCs although metabolic profile, TG content and glucose sensitivity were similarly promoted compared to HFD fed mice. We did not assessed the phenotype of NKT cells in HFD/F fed mice, but their increase number could be associated with a pro-inflammatory phenotype dampening KC activation.

Then, nutrients were able to differently induce liver inflammation pathways. We found that these discrepancies were associated with specific changes in the composition of the gut microbiota. It has been described that *Bacteroidetes* were decreased in obese and associated with liver inflammation (16, 26, 27). However, a more recent study in obese adolescent showed a significant increase of *Bacteroidetes* (28). As fructans, which are polymers of fructose, favored the *Bacteroides* growth (29), the amount of fructose in the daily intake could explained these discrepancies. The fructose diet induced specifically an increase of *Erysipelotrichi* and prevented the large decreased of MIB induced by a HFD diet. Altogether these data showed that fructose modified gut microbiota according to the fat content in the diet. Previous studies using water containing 30% fructose described a steatosis in fructose fed mice and antibiotics were able to decrease the TG accumulation (10). They

also showed a dependance on Toll like receptor 4 (TLR4) expression suggesting a possible role of microbiota (30). Then, as the dysbiosis was different between mice consuming fructose or not, we suggest that bacteria and microbial patterns could act differently to activate KCs as we shown here. As it has been shown that DNA bacterial content was increased in HFD fed mice, we assessed the bacterial DNA in livers and confirmed that bacterial DNA content was increased (31). Fructose did not induced significant differences in DNA translocation reinforcing the importance of bacteria species in deleterious effect of microbiota and their role on KCs activation. Indeed, KCs by their phagocytic function clear bacterial compounds from the systemic vasculature. HFD diet induced a dysregulation of lipid metabolism associated with a pro-inflammatory phenotype and disturbances of phagocytic functions (4, 32). Then, the clearance of bacterial patterns, and more specifically patterns of specific bacteria, was modified and could participate in liver damage (14).

In conclusion, we showed that fructose induced differential dysbiosis in HFD fed mice which seemed lowering activation of KCs but inducing a direct higher recruitment of intrahepatic lymphocytes. As the microbiota composition is modified by the diet composition, identification of microbial patterns and metabolites produced by the gut microbiota appears to be a new challenge to decipher mechanisms involved in inflammatory liver damage rather than the only identification of specific bacterial species. Specific patterns will probably assigned in liver disease and will clarify the role of KCs in dampening the liver damage or not.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mylène Levant and the Animex platform for animal husbandry. We also thank Dr. Moez Rhimi for gift of *E. coli* culture.

## REFERENCES

1. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002;346:1221-1231.
2. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999;116:1413-1419.
3. Guebre-Xabier M, Yang S, Lin HZ, Schwenk R, Krzych U, Diehl AM. Altered hepatic lymphocyte subpopulations in obesity-related murine fatty livers:

Ferrere G. et al

- potential mechanism for sensitization to liver damage. *Hepatology* 2000;31:633-640.
4. Leroux A, Ferrere G, Godie V, Cailleux F, Renoud ML, Gaudin F, Naveau S, et al. Toxic lipids stored by Kupffer cells correlates with their pro-inflammatory phenotype at an early stage of steatohepatitis. *Journal of hepatology* 2012;57:141-149.
  5. Lustig RH. Fructose: metabolic, hedonic, and societal parallels with ethanol. *Journal of the American Dietetic Association* 2010;110:1307-1321.
  6. Vos MB, Kimmons JE, Gillespie C, Welsh J, Blanck HM. Dietary fructose consumption among US children and adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Medscape journal of medicine* 2008;10:160.
  7. Rigottier-Gois L, Bourhis AG, Gramet G, Rochet V, Dore J. Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes. *FEMS microbiology ecology* 2003;43:237-245.
  8. Bigorgne AE, Bouchet-Delbos L, Naveau S, Dagher I, Prevot S, Durand-Gasselin I, Couderc J, et al. Obesity-induced lymphocyte hyperresponsiveness to chemokines: a new mechanism of Fatty liver inflammation in obese mice. *Gastroenterology* 2008;134:1459-1469.
  9. Velayudham A, Dolganiuc A, Ellis M, Petrasek J, Kodys K, Mandrekar P, Szabo G. VSL#3 probiotic treatment attenuates fibrosis without changes in steatohepatitis in a diet-induced nonalcoholic steatohepatitis model in mice. *Hepatology* 2009;49:989-997.
  10. Bergheim I, Weber S, Vos M, Kramer S, Volynets V, Kaserouni S, McClain CJ, et al. Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin. *Journal of hepatology* 2008;48:983-992.
  11. Schultz A, Neil D, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Hepatic adverse effects of fructose consumption independent of overweight/obesity. *International journal of molecular sciences* 2013;14:21873-21886.
  12. Wada T, Miyashita Y, Sasaki M, Aruga Y, Nakamura Y, Ishii Y, Sasahara M, et al. Eplerenone ameliorates the phenotypes of metabolic syndrome with NASH in liver-specific SREBP-1c Tg mice fed high-fat and high-fructose diet. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 2013;305:E1415-1425.
  13. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007;117:175-184.
  14. Balmer ML, Slack E, de Gottardi A, Lawson MA, Hapfelmeier S, Miele L, Grieco A, et al. The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. *Science translational medicine* 2014;6:237ra266.
  15. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JL. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:11070-11075.
  16. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JL. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006;444:1027-1031.
  17. Tetri LH, Basaranoglu M, Brunt EM, Yerian LM, Neuschwander-Tetri BA. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 2008;295:G987-995.
  18. Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, Unalp-Arida A, Colvin R, Johnson RJ, Diehl AM, et al. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010;51:1961-1971.
  19. Chung M, Ma J, Patel K, Berger S, Lau J, Lichtenstein AH. Fructose, high-fructose corn syrup, sucrose, and nonalcoholic fatty liver disease or indexes of liver health: a systematic review and meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition* 2014;100:833-849.
  20. Kohli R, Kirby M, Xanthakos SA, Softic S, Feldstein AE, Saxena V, Tang PH, et al. High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010;52:934-944.
  21. Morinaga H, Mayoral R, Heinrichsdorff J, Osborn O, Franck N, Hah N, Walenta E, et al. Characterization of distinct subpopulations of hepatic macrophages in HFD/obese mice. *Diabetes* 2015;64:1120-1130.
  22. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:958-969.
  23. Tacke F, Zimmermann HW. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *Journal of Hepatology* 2014;60:1090-1096.
  24. Li Z, Soloski MJ, Diehl AM. Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;42:880-885.
  25. Minagawa M, Deng Q, Liu ZX, Tsukamoto H, Dennert G. Activated natural killer T cells induce liver injury by Fas and tumor necrosis factor- $\alpha$  during alcohol consumption. *Gastroenterology* 2004;126:1387-1399.
  26. Le Roy T, Llopis M, Lepage P, Bruneau A, Rabot S, Bevilacqua C, Martin P, et al. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* 2013;62:1787-1794.
  27. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JL. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006;444:1022-1023.
  28. Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhouri R, Baker RD, Gill SR. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology* 2013;57:601-609.
  29. Sonnenburg ED, Zheng H, Joglekar P, Higginbottom SK, Firbank SJ, Bolam DN, Sonnenburg JL. Specificity of polysaccharide use in intestinal bacteroides species determines diet-induced microbiota alterations. *Cell* 2010;141:1241-1252.
  30. Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Haub S, Bischoff SC, Bergheim I. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology* 2009;50:1094-1104.
  31. Denou E, Lolmede K, Garidou L, Pomie C, Chabo C, Lau TC, Fullerton MD, et al. Defective NOD2 peptidoglycan sensing promotes diet-induced inflammation, dysbiosis, and insulin resistance. *EMBO molecular medicine* 2015;7:259-274.
  32. Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:2557-2562.



### I.3. Résultats complémentaires et discussion

Les mécanismes à l'origine de la transition de la stéatose vers la NASH et en particulier le rôle des macrophages sont mal compris. Pour cet article, je me suis intéressée au rôle de la KC dans cette transition vers la NAFLD.

En effet, les cellules de Kupffer peuvent présenter différents phénotypes : pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire. Les KC ayant un phénotype pro-inflammatoire peuvent donc induire un recrutement de cellules immunitaires et être ainsi des actrices majeures dans les étapes précoces du développement de la maladie.

Dans cet article, nous n'avons pas pu montrer que le recrutement de la KC était augmenté dans les foies au stade de la stéatose (HFD et *ob/ob*). Ces résultats étaient cohérents avec la littérature de 2012 qui montraient une absence de recrutement des KC dans des modèles avec un régime déficient en choline (110) ou un régime riche en graisses (124). Cependant, une étude récente utilisant un modèle de souris obèses similaire au notre montre une augmentation du nombre de KC par immunohistochimie (251).

L'accumulation de lipides au sein des KC issues de foie de souris obèse soulignait l'importance d'étudier le métabolisme lipidique au sein de la KC. Les avancées récentes sur le rôle des lipides comme médiateurs dans l'immunité renforçaient l'importance de cette hypothèse. Plusieurs études montraient que les macrophages du TA avaient un profil pro-inflammatoire au cours de l'obésité (252, 253). Tout comme les macrophages du TA, nous avons montré que les KC issues de foies stéatosiques (fat-laden KC) sécrètent plus de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires en condition basale. De plus, ces KC sont plus sensibles au LPS que les KC issues de souris contrôles. Dans nos études effectuées *in vitro* et *in vivo*, le fat-laden KC recrutent davantage les différentes populations lymphocytaires comparées aux souris contrôles. Ainsi, le phénotype pro-inflammatoire des KC de souris obèses a été corrélé à leur capacité à recruter davantage les lymphocytes.

Par ailleurs, l'étude des lipides contenus dans le foie et la KC a montré que le métabolisme des lipides y était fortement perturbé. Les diacylglycérols, qui sont des lipides toxiques sont considérablement augmentés dans les fat-laden KC (254, 255). On peut y voir également une augmentation significative des céramides et du cholestérol dans ces KC de souris obèses et les niveaux relatifs des espèces lipidiques ont été entièrement redistribués.



Les changements de répartition du cholestérol libre et des esters de cholestérol montrent que le métabolisme du cholestérol est dérégulé. En effet, des études faites chez l'Homme et la souris montrent une accumulation du cholestérol libre et des modifications dans l'homéostasie du cholestérol pendant la NAFLD (256).

Par ailleurs, l'accumulation de diacylglycérols et de céramides peut intervenir dans la voie de signalisation à l'insuline et conduire à l'insulino-résistance (257). L'analyse de la lipidomique montre également que cette accumulation de diacylglycérols n'est pas due à un défaut de synthèse de triglycérides. L'expression des gènes de nombreuses enzymes impliquées dans la synthèse de lipides, leur stockage et leur transport, est dérégulée. Cependant, en utilisant un inhibiteur de la lipogenèse *de novo*, le TOFA dans notre étude, nous avons pu montrer que le phénotype pro-inflammatoire de la fat-laden KC est réprimé. Ainsi, le métabolisme des lipides participe directement au phénotype pro-inflammatoire des KC de foies stéatosiques. Ces observations confirment que le maintien d'un phénotype non-inflammatoire de la KC améliore les lésions hépatiques liées à l'obésité (126).

Une meilleure connaissance des mécanismes de l'inflammation pourrait permettre de développer de nouvelles voies thérapeutiques, d'une part, en modulant certains récepteurs spécifiques aux macrophages résidents ce qui permettrait de réguler leur fonction dans les processus inflammatoires sans pour autant affecter l'homéostasie tissulaire. D'autre part, un contrôle de la quantité ou la nature des lipides accumulés au cours de la stéatose pourrait permettre de limiter l'inflammation. Dans cette optique, mon équipe et moi-même nous sommes intéressés au ciblage de la KC. Des études avaient précédemment montré que l'on peut cibler la KC via la délivrance orale de nanoparticules contenant des siRNA (pour l'anglais *Small Interfering RNA*) dirigées contre les cytokines. Ce traitement permettait de réduire l'inflammation (258).

Compte tenu de nos résultats j'ai entamé un projet visant à cibler spécifiquement le métabolisme lipidique dans la KC via l'utilisation de nanoparticules. Le but étant de contrôler spécifiquement le contenu des lipides dans la KC, réduire le profil pro-inflammatoire et donc l'inflammation hépatique.

Dans nos études, les nanoparticules pouvaient contenir des siRNA dirigés contre des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides ou des céramides ou bien des molécules inhibant directement ces enzymes.

Dans ce cadre, j'ai participé aux études préliminaires du projet, j'ai tout d'abord déterminé les rapports de nanoparticules et de siRNA n'entraînant pas de cytotoxicité de macrophages en culture. De plus, j'ai prouvé que ces nanoparticules chargées avec des siRNA dirigés contre la FAS ou l'ACC permettaient bien de réduire la présence de l'ARNm de ces protéines. Dans des études *in vivo*, j'ai déterminé les quantités injectables de nanoparticules nécessaires pour minimiser le ciblage extra-hépatique. En effet, l'ajout de clodronate dans les nanoparticules est une technique de ciblage utilisée pour dépléter le foie en cellule de Kupffer. Cependant, dans ces expériences le ciblage extra-hépatique n'est en général pas abordé. Nos expériences prouvent que ce ciblage était loin d'être négligeable et devait être contrôlé pour éviter de cibler d'autres organes que le foie. Ces résultats préliminaires réalisés *in vitro* et *in vivo* démontrent la spécificité hépatique et l'inhibition possible des cibles choisies. Ce sont des observations très prometteuses pour un ciblage des KC dans un objectif thérapeutique.

Ces travaux ont été menés en collaboration avec deux équipes de chimistes de la Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry et ont fait l'objet d'un financement par le LabEx LERMIT (*Laboratoire d'Excellence en Recherche sur le Médicament*) mais doivent actuellement rester confidentiels.

Ces données sur l'implication de la fat-laden KC dans la progression vers la NASH ainsi que la bibliographie grandissante sur le rôle potentiellement délétère du fructose dans la NAFLD, m'a dirigé vers des études sur l'impact du fructose. En effet, la modification des habitudes alimentaires dans les pays occidentaux montre une augmentation du pourcentage de fructose dans l'alimentation passant de 4 % jusqu'à 12 % des calories totales (259). Cette augmentation est le reflet non seulement d'un mode de vie différent qui privilégie la restauration rapide (fast-food ou cafétéria) (260), mais aussi, de façon plus importante, de la substitution du saccharose par le fructose (261).

Mon objectif a donc été d'étudier si les effets délétères du fructose pouvaient passer par une activation exacerbée de la KC.

L'ajout de fructose au régime gras (HFD/F) entraîne une augmentation de l'infiltration lymphocytaire plus importante chez ces souris que celles nourries uniquement avec le régime HFD.

Ainsi, notre hypothèse était que cette infiltration lymphocytaire augmentée pouvait être liée à l'augmentation du profil pro-inflammatoire des KC des souris HFD/F. Cependant, nos travaux ont montré que le profil des KC était nettement moins activé chez ces souris HFD/F comparé aux souris HFD. Contrairement aux résultats que je vous ai exposé dans le premier article montrant que la KC des souris sous régime gras avaient un profil pro-inflammatoire, l'ajout de fructose n'induit pas les mêmes modifications sur l'activation des KC et ceci malgré une infiltration lymphocytaire augmentée dans le foie en présence de fructose. Ces résultats nous ont surpris et donc nous avons voulu nous concentrer sur les facteurs qui interviennent sur cette inactivation du profil des KC. Notre étude s'est alors dirigée vers le MI, un facteur reliant directement l'alimentation, le foie et l'intestin et qui peut agir sur les KC. En effet, le MI est modifié chez les obèses avec une diminution des *Bacteroidetes* et une augmentation des *Firmicutes* (229). Il est maintenant connu que les différents apports en nutriments riches en graisses et en carbohydrates participent à la modification du MI (Chapitre VI).

Des études antérieures ont montré que l'ajout de fructose dans l'eau de boisson entraînait une stéatose et l'ajout d'antibiotique suffisait à réduire l'accumulation de triglycérides (262). Ceci souligne l'impact possible du fructose sur les bactéries du MI et le développement de la NAFLD. Comme le fructose peut être un substrat idéal pour les bactéries contenues dans l'intestin, j'ai donc regardé l'impact du fructose sur le MI selon les différents régimes. L'étude du MI dans nos travaux a montré que les souris nourries aux régimes contenant du fructose, aussi bien ND/F que HFD/F, présentaient comme seule différence significative, une augmentation des *Erysipelotrichi*.

En effet, le glucose et le fructose sont des substrats favorisant la croissance des *Erysipelotrichi*. De plus, l'implication des *Erysipelotrichi* dans la NAFLD a notamment été décrite dans laquelle les patientes consommaient une quantité normalisée de choline. Ces études ont montré que la choline influait sur la pathogenèse des NAFLD et avait des effets sur le MI. Notamment, il existait une corrélation entre l'abondance des *Erysipelotrichi* et des *γ-Proteobacteria* et le taux de graisses dans le foie de ces patientes (230). Ces résultats montrent que les bactéries du MI stimulées par le fructose peuvent participer à l'installation de la stéatose en présence d'un régime gras.

L'ensemble de ces travaux sur la NAFLD a permis de souligner l'implication de la KC dans l'inflammation hépatique au cours de la NAFLD en particulier parce que la KC est touchée tout comme les hépatocytes par des dérégulations du métabolisme des lipides.

De plus, l'étude de l'impact du fructose en présence ou non d'un régime gras a permis de confirmer l'importance du régime sur l'apparition d'une dysbiose intestinale. Cette dysbiose impacte sur les KC différemment selon les populations bactériennes touchées.

Ce travail aurait sans doute mérité une analyse plus fournie en particulier par un séquençage des ADN bactériens permettant une analyse plus poussée que celles réalisée par une analyse en FISH. Afin de montrer la relation entre le MI et le profil inflammatoire des macrophages hépatiques, des expériences réalisées *in vitro* ont été réalisées. Les surnageants de selles de nos souris des différents régimes ont été mis en contact avec des macrophages en culture. Malheureusement, l'activation de macrophages par ces surnageants n'a pas montré de différences. Compte tenu de la complexité du MI, des cultures préalables de bactéries permettant de scinder en sous-groupes ces prélèvements auraient sans doute permis d'obtenir des résultats plus concluants. Nous développons actuellement une collaboration avec des microbiologistes de l'INRA afin de pouvoir prochainement réaliser ce type d'expérience.



## **II. Le rôle causal du microbiote intestinal dans la maladie alcoolique du foie**



## II.1. Introduction

Les boissons alcoolisées sont largement consommées dans la population actuelle. La consommation excessive d'alcool est responsable de pathologies importantes, notamment la maladie alcoolique du foie. La MAF est parmi les principales causes de cirrhose hépatique et de mort liées à une hépatopathie depuis des décennies. Cependant, cette consommation d'alcool n'est pas proportionnelle aux lésions hépatiques rencontrées chez les patients. En dépit d'une consommation d'alcool similaire, certains patients développent des formes sévères de MAF, avec des taux de mortalité élevés, tandis que d'autres ne présentent pas d'hépatopathie sous-jacente (194). Par conséquent, il existe d'autres facteurs que la toxicité directe de l'alcool qui influencent la MAF et sa progression. Par ailleurs, l'augmentation de la perméabilité de l'intestin dans la MAF a été associée à une inflammation intestinale induite par une dysbiose. Dans cette étude, j'ai étudié dans un modèle murin d'alcoolisation si le MI peut directement être lié aux risques de développer une MAF et ceci indépendamment de la consommation d'alcool.

L'objectif de ce travail a donc été : 1/ d'établir l'existence d'une dysbiose du MI associée aux lésions hépatiques dans un modèle murin d'alcoolisation, 2/ de corriger cette dysbiose par des traitements et d'étudier leurs effets sur les lésions au niveau du foie et de l'intestin et 3/ d'établir le profil des populations bactériennes engagées dans la résistance ou la sensibilité à l'alcool.

Pour cela, nous avons alcoolisé des souris sur deux sites géographiques différents avec la même méthodologie. Les paramètres physiopathologiques caractéristiques de la MAF ont été vérifiés notamment par le dosage des transaminases plasmatiques et des triglycérides hépatiques, la détermination d'un score de stéatose visible en anatomopathologie, et l'expression des cytokines/chimiokines pro-inflammatoires quantifiées par PCR quantitative. L'analyse du MI a été faite par FISH couplée à la cytométrie en flux ainsi que par séquençage à haut débit du gène codant l'ARN 16S.



Ce travail a prouvé que, comme chez l'Homme, il existe dans les modèles murins une hétérogénéité face au risque de développer une MAF. Les souris sensibles à l'alcoolisation présentaient des lésions hépatiques et intestinales alors que les souris résistantes n'en présentaient pas. Ces lésions chez les souris sensibles ont été corrélées à la diminution des *Bacteroides*, une population majeure du MI. Afin de déterminer si cette diminution des *Bacteroides* était directement liée à l'apparition des lésions hépatiques, la correction de cette baisse des *Bacteroides* a été entreprise par deux approches différentes :

1/ Un traitement probiotique basé sur le transfert de MI des souris résistantes, ayant des proportions élevées de *Bacteroides*, aux souris sensibles. C'est la fécalothérapie ou FMT (pour l'anglais *Fecal Microbiota Transfert*).

2/ L'ajout d'un prébiotique, la pectine, substrat connu pour favoriser la croissance des *Bacteroides*.

Ces deux traitements ont été donnés aux souris avant même toute alcoolisation et ont permis le maintien des proportions des *Bacteroides* ainsi que la prévention des lésions hépatiques chez les souris alcoolisées.

Afin d'analyser plus précisément les espèces bactériennes impliquées dans cette protection face aux lésions hépatiques induites par l'alcool, un séquençage à haut débit du gène codant l'ARN 16S bactérien a été réalisé. Les analyses du séquençage 16S montrent que le microbiote des souris est différent en fonction de l'alcoolisation mais également en fonction de la susceptibilité des souris face à la toxicité de l'alcool. Au niveau des phyla bactériens, on retrouve une diminution des *Bacteroidetes* chez les souris sensibles à l'alcool, ainsi qu'une augmentation des *Proteobacteria*. Lorsque les souris sont alcoolisées, on détecte principalement une augmentation des *Actinobacteria* chez les souris sensibles. Cette analyse a permis de mettre en évidence l'efficacité des traitements FMT et pectine pour contrôler le MI et corriger les lésions hépatiques.

Ces résultats sont présentés dans l'article actuellement en préparation. Pour terminer la rédaction, il nous manque des analyses concernant le séquençage du MI, ces analyses qui sont réalisées par un post-doctorant actuellement au Canada (William Turpin). Il nous manque également les données concernant l'atteinte de la barrière intestinale.

Compte-tenu de cela, les résultats acquis sont présentés sous le format d'un papier en préparation, mais la discussion du papier est écrite en français dans la partie discussion à la suite de l'article.

***Ces travaux font l'objet d'un article qui est en cours de préparation. J'ai participé aux expérimentations, à l'analyse des résultats et la rédaction de l'article. Je suis co-premier auteur de cet article au même titre que Laura Wrzosek et Frédéric Cailleux.***



## II.2. Article

### **Inhibition of hepatic alcohol toxicity by correcting intestinal dysbiosis in mice**

***Gladys Ferrere\****, *Laura Wrzosek\**, *Frédéric Cailleux\**, *Williams Turpin*, *Virginie Puchois*, *Dragos Ciocan*, *Françoise Gaudin*, *Marie-Louise Noordine*, *Dominique Berrebi*, *Muriel Thomas*, *Sylvie Naveau*, *Gabriel Perlemuter*, *Anne-Marie Cassard*.

*En préparation*



## Inhibition of hepatic alcohol toxicity by correcting intestinal dysbiosis in mice

**Gladys Ferrere**<sup>1,2\*</sup>, **Laura Wrzosek**<sup>1,2\*</sup>, **Frédéric Cailleux**<sup>1,2\*</sup>, **Williams Turpin**<sup>3</sup>, **Virginie Puchois**<sup>1,2</sup>, **Dragos Ciocan**<sup>1,2</sup>, **Françoise Gaudin**<sup>1,2</sup>, **Marie-Louise Noordine**<sup>4</sup>, **Dominique Berrebi**<sup>1,5</sup>, **Muriel Thomas**<sup>4</sup>, **Sylvie Naveau**<sup>1,2,6</sup>, **Gabriel Perlemuter**<sup>1,2,6</sup>, **Anne-Marie Cassard**<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>INSERM U996, DHU Hepatinov, Labex LERMIT, IPSIT, Clamart, France.

<sup>2</sup>Univ Paris-Sud, CHU Bicêtre, Kremlin-Bicêtre, France.

<sup>3</sup>Division of Gastroenterology, Zane Cohen Centre for Digestive Diseases, Mount Sinai Hospital, Toronto, ON, M5T 3L9, Canada; Department of Medicine, University of Toronto, ON, M5S 1A8, Canada

<sup>4</sup>INRA, UMR 1319 MICALIS, AgroParisTech, Jouy-en-Josas, France.

<sup>5</sup>AP-HP, Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Hôpital Robert Debré, Paris, France.

<sup>6</sup>AP-HP, Hepatogastroenterology and Nutrition, Hôpital Antoine-Béclère, Clamart, France.

\* authors contribute equally to this work

### ABSTRACT

**Background & Aims:** Alcoholic liver disease (ALD) is a leading cause of liver failure and mortality. It was showed that gut microbiota influence the development of liver injury. In human, acute alcoholic hepatitis was associated with key changes of the intestinal microbiota (IM) which drives the individual sensitivity to advanced ALD. As mice showed a similar sensitivity to alcohol, we studied IM and developed treatments to reverse dysbiosis and prevent ALD.

**Methods:** Mice were alcoholized in two animal facilities with a Lieber DeCarli diet, added with ethanol or isocaloric maltodextrin. IM transfer were realised with fresh feces from alcohol-resistant donor mice. Alcohol-sensitive receiver mice were force-fed 3 times a week. Mice receiving the pectin treatment were treated during all the alcohol consumption period.

**Results:** The alcohol sensitivity of mice is dependant on the animal facility. In sensitive mice, ethanol induced steatosis and liver inflammation. Conversely, alcohol-resistant mice did not develop liver lesions. IM analysis showed that *Bacteroides* were specifically decreased in alcohol sensitive mice. Restoring this population with a fecal microbiota

transfer from alcohol resistant mice, or via feeding mice with pectin, a prebiotic increasing *Bacteroides* growth, allowed the inhibition of liver injury in alcohol sensitive mice. A deep analysis of IM confirmed that *Bacteroides* were decreased in alcohol-sensitive mice. Moreover, fecal microbiota transfert restored a microbiota very close of the donor resistant mice.

**Conclusions:** As in human, alcohol-induced liver disease is driven by IM. Controlling IM by fecal microbiota transfert or a prebiotic treatment is efficient to prevent ALD.

**Keywords:** Alcohol liver disease; microbiota; dysbiosis; fecal microbiota transfer; prebiotic

In preparation

Corresponding authors:

adress : INSERM UMR\_S996 32, rue des Carnets, 92140 Clamart, France.

E-mail : cassard.doucier@u-psud.fr (Dr. CASSARD)

### List of abbreviations

ALD: Alcohol liver diseases, IM: Intestinal microbiota, FISH-FCM: Fluorescent in Situ Hybridization combined with Flow Cytometry, Alc: Alcoholized, Ctrl: control, TG: Triglycerides, ALT: Alanine Transferase, FMT: Fecal microbiota transfer, LDC: Lieber DeCarli diet, OTU : operational taxonomic unit, PCoA : principal coordinate analysis.

## INTRODUCTION

Chronic alcohol consumption is the major etiological factor of chronic liver disease in the world. Despite this major public health concern, factors that link ethanol intake to the onset and progression of liver injury are poorly deciphered. In fact, among long-term heavy drinkers, the majority of patients will develop fatty liver (i.e. steatosis) but only 10-35% liver inflammation (i.e. hepatitis) and 8-20 % will progress to cirrhosis (1). Therefore, important factors other than the only quantity of alcohol intake influence the onset and progression of alcoholic liver disease (ALD). Among these factors, it is now admitted that gut bacteria play a role in the pathogenesis of ALD (2). Currently, human intestinal microbiota (IM) encompasses 10<sup>10</sup> to 10<sup>11</sup> trillion microorganisms and harbors more than 1000 different bacterial species opening a vast field of potential targets and molecular technics allowed to investigate this bacterial diversity (3). IM plays an important role in the maintenance of the intestinal barrier: on one hand by preventing colonization by pathogen bacteria (4) and on the other hand by cooperating with the intestinal epithelium to produce mucin (2, 5, 6). It is well established that the gut leakiness is associated with ALD (7-9) and more recent data could suggest that intestinal barrier disruption is a prerequisite to liver injury in ALD (10, 11). If the liver metabolizes 80% of total ethanol, the role of IM in the ethanol metabolism is not clear. However several bacteria harbour an alcohol dehydrogenase activity and metabolize ethanol, producing acetaldehyde (12). Alcohol intake leads to dysbiosis in humans and also in animals (13-18). In adult human cohort, dysbiosis was modified by oral supplementation with probiotics and

associated with restoration of IM and function of several hepatic enzymes (13). Dysbiosis was specifically addressed in cirrhotic patients and authors established a “cirrhosis dysbiosis ratio” associated with cirrhosis progression (19). Moreover, a very recent publication showed that cirrhosis was associated with alterations of the human gut microbiome highlighting 15 discriminating microbial genes (20). Recently, it has been shown that, dysbiosis was not only associated with alcohol intake or the severity of cirrhosis but that IM is directly involved in driving the individual susceptibility to ALD.

Altogether these data show that the IM is modified by alcohol and drives the development of ALD. It also exists an alcohol sensitivity in mice. In rodents, dysbiosis was associated with alcohol intake and some studies showed an improvement of liver injury by prebiotics or probiotics (17, 21, 22).

It has been previously established that breeding facilities could influence IM composition (23) and we showed that, as in human, it exists a susceptibility of mice to develop alcohol-induced liver lesions. We aimed at studying IM associated with alcohol-induced liver lesions in mice. Then, we established that controlling IM by fecal microbiota transfer or prebiotic use prevent the development of alcohol-induced liver damage.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animal experimentation*

Female C57BL/6J were purchased from Janvier laboratory (Le Genest, France). The procedure for housing and alcoholized mice and IM transplant are described in the supplemental section. Tissues and samples prelevements are detailed in supplemental section. All of the animal experimental procedures

were validated by the local ethical committee CEEA26.

**Measurement of liver triglycerides and transaminases.** Portions of frozen liver were used to quantify liver triglycerides and transaminases were measured in serum as reported in supplemental section.

**Liver and gut histology.** Liver and gut (ileum, colon) were fixed overnight in 4% paraformaldehyde and then embedded in paraffin. Hematoxylin and Eosin (H&E) staining and immunohistochemical staining of paraffin sections were performed as described in supplemental section.

**RNA extraction and quantification.** All tissues were homogenized in Qiazol (Qiagen) and extracted. RNA integrity was determined and q-PCR reactions were performed on a Light Cycler 480 (Roche Diagnostics). Details are reported in supplemental section. Primer sequences are listed in supplemental Table 2.

**Analysis of the gut microbiota.** Bacterial species composition of feces samples were determined by Fluorescence in Situ Hybridization combined with Flow Cytometry (FISH-FCM) for experiments showed in Fig. 2A and 2C, supplemental Fig. 2, 3 and 4. All others results concerning microbiota analysis were performed by identification of bacterial species by sequencing and are carefully described in supplemental section.

**Statistical analyses.** Results are represented as mean±SEM. Statistical analysis were performed by Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests (Graphpad Prism, Graphpad Software

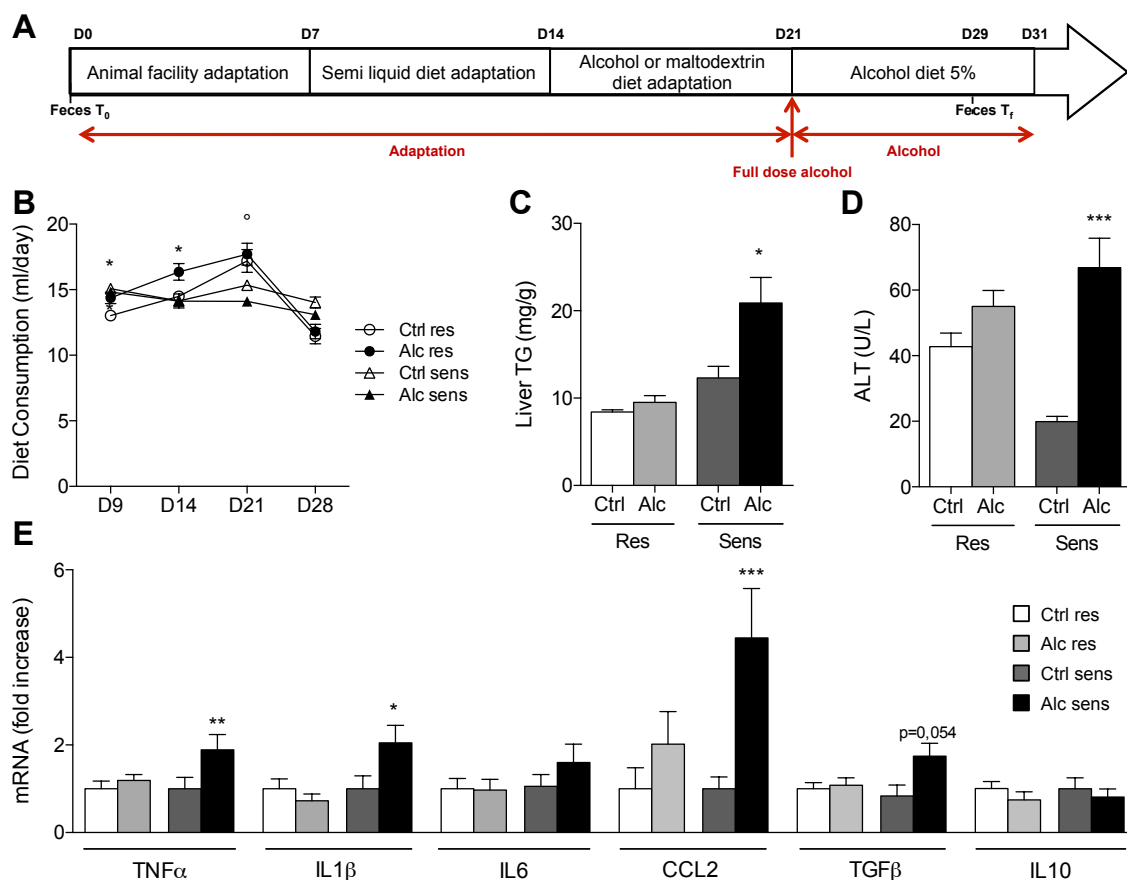
Inc, La Jolla, California, USA) ;  $p < 0,05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### Liver alcoholic damages were different in the two animal facilities.

We alcoholized mice using the Lieber-DeCarli diet in two animal facilities. Mice were protected from the development of alcohol-induced liver lesions in one husbrandy and are defined as alcohol-resistant mice. Conversely, alcoholized mice which showed liver lesions are named alcohol-sensitive mice. Mice were progressively adapted to the ethanol diet over one week, then chronically fed ethanol diet for ten days (Fig. 1A). iet consumption was slightly higher in the group of alcohol-resistant mice compared to the control-resistant mice (Fig. 1B). This increase was observed before alcohol was added in the diet (day 14) and without any difference of body weight (Supplemental Fig. 1A). This higher consumption of diet was not maintain after the addition of alcohol in the diet. Similarly, we noticed a slightly higher diet consumption in the control-sensitive mice compared to the alcohol-sensitive mice at day d21 which was not observed later. The weight gain of mice was not significantly different during alcohol adaptation but alcoholized mice lost weight compared to the control mice at the end of the alcohol diet, despite consuming similar amounts of diets (Supplemental Fig. 1A). There were no differences in liver weights, however hepatic lesions induced by alcoholization in the two animal facilities were clearly different (Supplemental Fig. 1B). A significant steatosis was detected in alcohol-sensitive mice as quantified by the TG content (Fig. 1C).



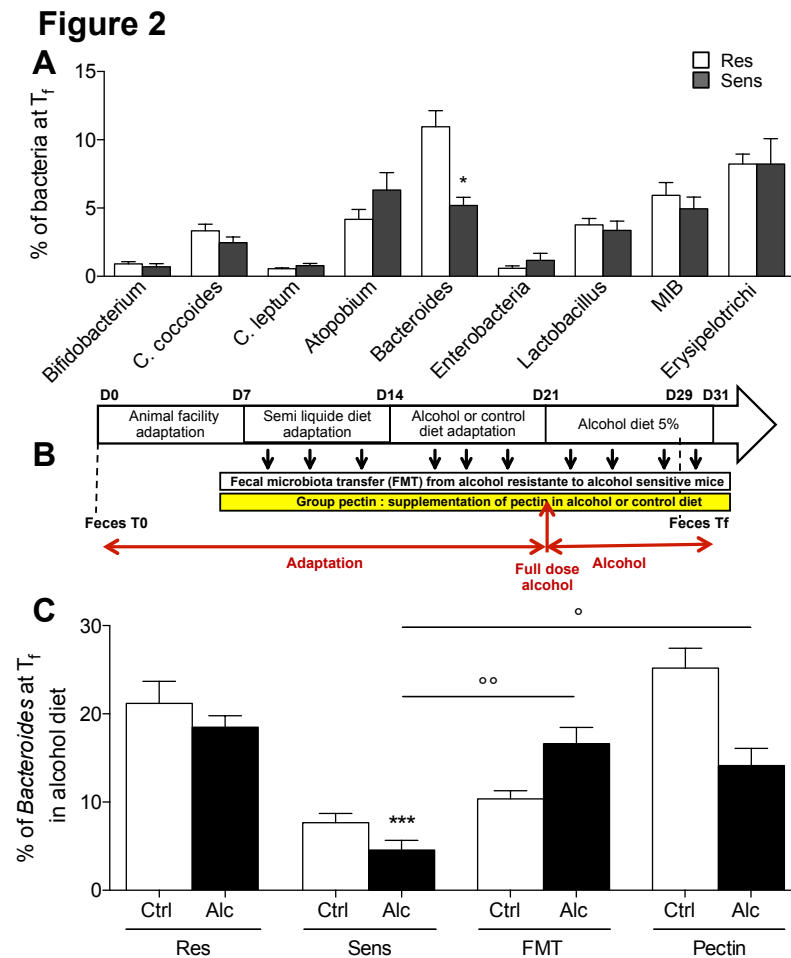
**Figure 1**

**Figure 1: Effect of alcoholization of mice on diet consumption, steatosis and liver inflammation.** (A) mice were adapted to the Lieber-DeCarli diet (LDC), then they were progressively alcoholized before 10 days of 5% alcoholized or maltodextrin diet. Resistant mice (res) did not develop alcohol injury whilst sensitive mice (sens) develop liver injury, (B) diet consumption, (C) liver triglycerides, (D) ALT levels, (E) Fold increase of mRNA expression in the liver for the following genes determined by quantitative real-time PCR: TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, CCL2, TGF $\beta$  and IL10. \*, °:  $p < 0.05$ , \*Ctrl res vs Alc res, °Ctrl sens vs Alc sens. Ctrl res  $n = 8$ ; Alc res  $n = 12$ ; Ctrl sens  $n = 18$ ; Alc sens  $n = 21$ .

Liver histology showed significant steatosis and the semi-quantitative score of steatosis was significantly increased in livers alcohol-sensitive mice (**Supplemental Fig. 1C and D**). This steatosis was associated to a significant increase of ALT (**Fig. 1D**).

Alcoholization induced liver inflammation compared to control groups as shown by the significant increase of inflammatory markers (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , CCL2) (**Fig. 1E**). IL6 and TGF $\beta$  showed increase tendency but IL10 was not significantly modified. These results highlighted that other factors than alcohol are involved in the onset of hepatic lesions during alcoholization.

**Liver damages due to alcoholization were correlated to high level of *Bacteroides*.** Although there were no differences in alcohol diet consumption and the health report between the two animal facilities, we hypothesized that intestinal microbiota could be involved in alcohol-induced liver lesions. The IM composition before alcoholization was similar in all groups of mice (**Supplemental Fig. 2A**). Alcohol consumption induced a significant decrease of *Clostridium coccoides* and *leptum* and *Enterobacteria* independantly of the husbandry (**Supplemental Fig.3 A and B**).



**Figure 2: Low level of *Bacteroides* restored by fecal microbial transfer or pectin treatment.** (A) Relative abundance of bacteria after alcohol diet in resistant and sensitive mice determined by FISH analysis, \*:  $p < 0.05$ . Alc res  $n=11$ ; Alc sens  $n=10$ . (B) Ethanol diet timeline is identical to figure 1, the pectin group received 6.5% pectin added to the diet from day 7 until the sacrifice, the fecal microbiota transfer (FMT) group was force-fed with fresh feces three times a week from d7, (C) Efficiency of the FMT and the pectin treatment onto the level of *Bacteroides* in control or alcohol resistant and sensitive mice. \*:  $p < 0.05$ , °:  $p < 0.005$ , °°,  $p < 0.0001$ . \*Ctrl res vs Alc res, °Ctrl sens vs Alc sens. Ctrl res  $n=5$ ; Alc res  $n=16$ ; Ctrl sens  $n=9$ ; Alc sens  $n=8$ ; Ctrl FMT  $n=4$ ; Alc FMT  $n=7$ ; Ctrl pectin  $n=6$ ; Alc pectin  $n=4$ .

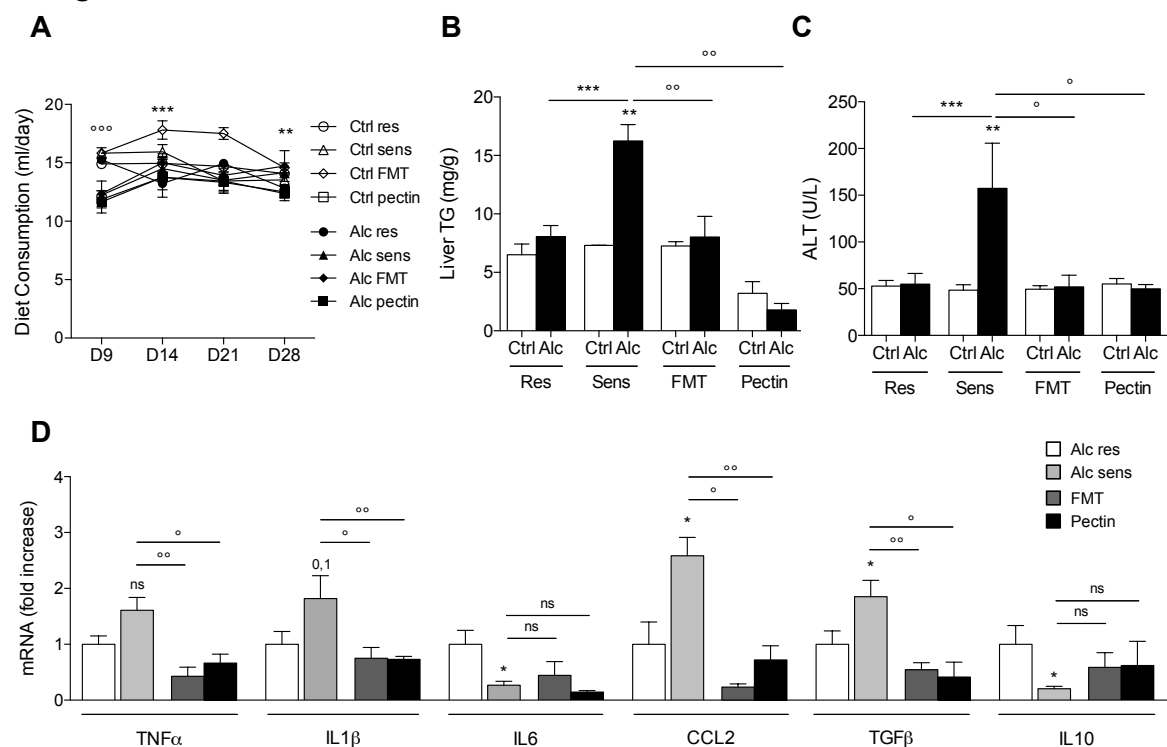
The decrease of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* was significant in one of the animal facilities with a decrease tendency in the other one. Only one class of bacteria, *Erysipelotrichi* were significantly increased by alcohol diet in alcohol-resistant mice. Except for *Erysipelotrichi*, alcohol induced similar evolution of IM independantly of the husbandry. We analyzed IM regardless of alcohol consumption rather than differences between animal facilities. Interestingly, we found that alcohol-sensitive mice showed a systematic 50% decreased of *Bacteroides*, whatever the treatment, control or alcohol (Fig. 2A and Supplemental Fig. 2B).

**Correction of dysbiosis by fecal microbiota transfer or prebiotics restores IM** To demonstrate that the dysbiosis participates to the alcohol-

induced liver lesions, we performed a fecal microbiota transfer (FMT) from the alcohol-resistant mice to alcohol-sensitive mice. Furthermore, since *Bacteroides* were particularly decreased in alcohol-sensitive mice, we treated mice with pectin, a prebiotic increasing *Bacteroides* growth in intestinal microbiota (26). Recent publications described the relevance of fecal transfer to treat insulin sensitivity in human and infections in mice (27,28). However, the described protocols included a partial depletion of IM by antibiotics treatment or a polyethyleneglycol treatment. It has been largely proved by us and others that antibiotics improve hepatic lesions during non alcoholic hepatitis (29). Then, to avoid any impact on the development of liver lesions during a later alcohol consumption, neither antibiotics

treatment nor polyethyleneglycol treatment were performed. The fecal transfer began one week before alcohol (Fig. 2B). Recipient alcohol-sensitive mice were force-fed three times a week with fresh feces of donor resistant mice, until the end of the experiment. The FMT efficiency was checked by analysing IM at the end of the protocol. The FMT allowed to restore *Bacteroides* proportions in the faeces (Fig. 2C).

**Figure 3**



**Figure 3: Fecal microbial transfer or pectin treatment prevent alcohol-induced liver lesions.** (A) diet consumption, (B) liver TG, (C) ALT levels, (D) Fold increase of mRNA expression in the liver for the following genes determined by qPCR: TNFα, IL1b, IL6, CCL2, TGFb and IL10. \*: p<0.05, \*\*: p<0.005.

Similarly to the FMT, we treated mice with pectin before the beginning of the alcohol consumption. Pectin was directly added to the Lieber-DeCarli diet in the pectin treated groups until the end of the protocol. The pectin treatment induced a large increase of *Bacteroides* which were four fold increased in the control group and two fold increased in the alcoholized group compared to their respective group (Fig. 2 C and Supplemental Fig. 4B). MIB and

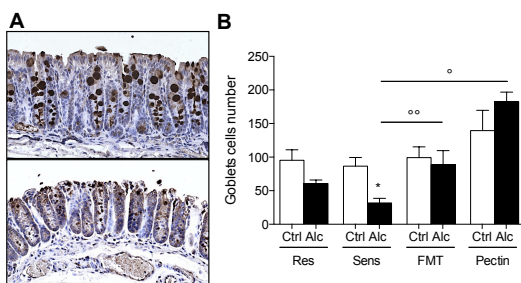
Interestingly, we observed that the difference in relative amounts of bacterial groups between resistant and sensitive mice was totally restored especially in alcohol groups (Supplemental Fig.4A). In control groups of mice, the FMT was not sufficient to restore the proportion of MIB and *Erysipelotrichi*, conversely to *Enterobacteria* (Supplemental Fig.4B).

*Erysipelotrichi* were decreased by the pectin treatment in the control group of mice (Supplemental Fig. 4B). *Enterobacteria* were decreased in the alcoholized group of mice. Altogether, the FMT and pectin treatment were efficient to maintain a high level of *Bacteroides*.

### Maintaining a high level of *Bacteroides* prevent the development of liver alcoholic lesions.

As shown in the previous experiment (Fig. 1B), the diet consumption was mainly similar in the different group of mice. However, we noticed a slightly significant higher consumption of control diet in sensitive and resistant mice which not observed throughout the time of the experiment (Fig. 3A). Mice body weight were significantly different, especially in the pectin treated mice despite no change in the diet consumption (Supplemental Fig. 5A). The high percentage of pectin in the diet induced diarrhea in pectin treated mice which could explain their lower weight. However, weight differences were similar those observed in the alcohol versus the control group of mice as described in our previous experiments (Fig.1). We could notice a lower liver weight in pectin treated mice (Supplemental Fig. 5B).

Figure 4



**Figure 4: Mucin and tight junctions alterations in resistant, sensitive and treated mice.** (A) Representative pictures and graphs showing counts of goblet cells staining with muc-2, (B) and semi quantitative scoring.

The TG quantification showed that the FMT or pectin treatment were sufficient to prevent the steatosis as also showed by liver histology (Fig. 3B and Supplemental Fig. 5C). The FMT or pectin treatment restored the transaminase level of alcohol-sensitive mice (Fig. 3C). Alcohol-induced liver inflammation as shown by the significant

increase in inflammatory markers (TNF, IL1b, CCL2, TGFb) with IL6 showing an increase tendency and IL10 a decrease tendency (Fig. 3D) as previously shown (Fig. 1E). FMT and pectin treatments were sufficient to restore levels of liver inflammatory markers similar to the ones of alcohol-resistant mice.

### Alcohol consumption induced mucin and tight junctions alterations improved by the correction of dysbiosis.

Analysis of structural gut epithelium shown no obvious ultrastructural changes in the intestinal mucosa after ten days of alcohol consumption (data not shown). As *Bacteroides* modulate the intestinal mucus barrier we analyzed the impact of alcohol on colon mucin production. The mucin production was significantly decreased in the alcohol-sensitive mice (Fig. 4A and B). The FMT and pectin which increases *Bacteroides* prevented the mucin production decrease.

### Identification of bacterial genus that are associated with alcohol-sensitive or alcohol-resistant mice.

To go further in the identification of bacterial species associated with alcohol-resistant mice, we performed deep sequencing analysis of 16S rRNA.

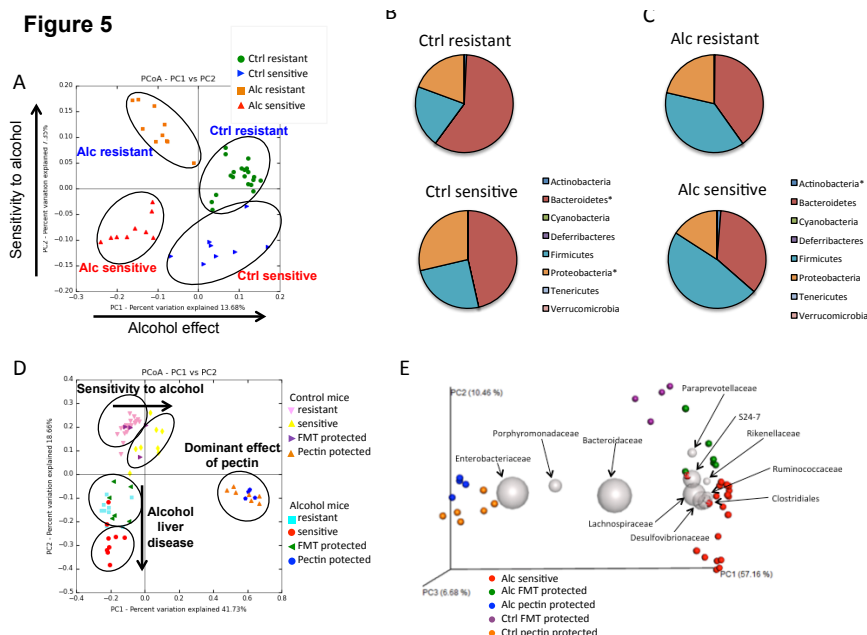
Gut microbiota composition was compared between alcohol-resistant mice and alcohol-sensitive mice fed with a control or an alcohol diet. Principal coordinate analysis (PCoA) of weighted and unweighted UniFrac distances based on operational taxonomic units (OTUs) confirmed that mice clustered differently based on their animal facilities and their control or alcohol diet (Fig. 5A and Supplemental Fig. 6A).

confirmed that mice clustered differently based on their animal facilities and their

control or alcohol diet (**Fig. 5A and Supplemental Fig. 6A**).

The weighted Unifrac metric is weighted by the difference in probability mass of OTUs from each community for each branch, whereas unweighted Unifrac only considers the absence/presence of the OTUs giving different informations. Cluster analysis demonstrated that the first coordinate PC1 (13.68% weighted and 15.28% unweighted) distinguished mice based on the diet, whilst the second coordinate PC2 (7.35% weighted and 59.58% unweighted) differentiated mice based on the sensitivity against alcohol (**Fig. 5A and Supplemental Fig. 6A**).

sensitivity to develop alcohol-induced liver lesions was addressed. Analysis of phyla showed significant decrease of *Bacteroidetes* in sensitive mice (**Fig. 5B and C**), confirming preliminary data obtained by FISH analysis (**Fig. 2A**) and conversely an increase in *Proteobacteria* and *Actinobacteria*. We next determined if FMT and pectin treatments reversed the dysbiosis observed in alcohol-sensitive mice. PCoA analysis showed that FMT was successful since treated mice clustered with resistant mice in both groups, alcohol and control mice proving that the FMT was sufficient to control the dysbiosis (**Fig. 5D**). The pectin



**Figure 5: Bacterial 16S rRNA-based analysis of the fecal microbiota of alcohol sensitive and resistant mice.** (A) Unweighted unifrac coords 2D principal coordinate analysis (PCoA) performed in resistant and sensitive mice fed LDC control or LDC-alcohol, Axis 1, percent variation explained 13.68 % and axis 2, percent variation explained 7.35 %. Each mice group is represented by a color code (alcohol-resistant mice on control diet, green circle ; alcohol-resistant mice on alcohol diet, orange square ; alcohol-sensitive mice on control diet, blue triangle and alcohol-sensitive mice on alcohol diet, red triangle, ( $p < 0.05$ ,  $R = 0.70$ , ANOSIM test), (B) Pie charts showing relative abundance of the bacterial phyla in microbiota of resistant and sensitive mice fed a LDC control diet, (C) or fed a LDC alcohol diet, \*  $p < 0.05$ , Bonferroni correction. (D) PCoA performed by using a Bray-Curtis distance measure. Axis 1, percent variation explained 41.73 % and axis 2, percent variation explained 18.66 %. Each mice group is represented by a color code (E) Unweighted unifrac biplot illustrating the relative degree that clusters sensitive and protected mice with (Alc) or without alcohol (Ctrl). The size of the sphere for each taxon is proportional to the mean relative abundance of that taxon across all samples. The five most abundant families were represented.

The alpha-diversity, estimating the diversity of bacterial species in a same group, were not different (**Supplemental Fig. 6B**). Identification of specific bacteria associated with the protection or conversely with the

treatment showed that pectin has a major effect which was dominant compared to the effect of alcohol.

Moreover, if the alpha-diversity was not modified by the FMT, pectin induced a dramatic decrease in the

diversity of bacterial species (**Supplemental Fig. 6B**). Biplot representation is suitable to identify taxa that drive the differentiation between groups of microbial communities (**Fig. 5E**). The pectin treatment was specifically associated with high proportions of *Enterobacteriaceae* and *Porphyromonadaceae* and highlighted the drastic impact on pectin onto the IM. At the family level, *Bacteroidaceae* were not clearly associated with the sensitivity or the protection against alcohol-liver injury suggesting that some specific species of *Bacteroides* which probably involved. However, *Paraprevotellaceae* and *S24-7* families were more represented in FMT protected mice than in sensitive mice. At the genus level, similar data were observed (**Supplemental Fig. 6C**).

Figures concerning the identification of specific OTUs based on the correlation of the OTU-ID and the database Greengene are currently performing. However, if we could assign a specie onto this ID number, this assignement is prediction based on the database assignment described of many papers using deep 16S sequencing.

**Acknowledgments.** The authors thank Mylène Levant and Valérie Domergue-Dupont for the follow-up of mice and Nicolas Sorhaindo for plasmatic quantifications. We also thanks Olivier Zemb for deep sequencing of bacterial DNA, Genotoul.

## REFERENCES

1. Teli MR, Day CP, Burt AD, Bennett MK, James OF. Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver. *Lancet* 1995;346:987-90.
2. Henao-Mejia J, Elinav E, Thaïs CA, Flavell RA. The intestinal microbiota in chronic liver disease. *Advances in Immunology* 2013;117:73-97.
3. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 2012;489:220-30.
4. Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature reviews. Immunology* 2013;13:790-801.
5. Johansson ME, Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 2013;10:352-61.
6. Wrzosek L, Miquel S, Noordine ML, Bouet S, Joncquel Chevalier-Curt M, Robert V, Philippe C, Bridonneau C, Cherbuy C, Robbe-Masselot C, Langella P, Thomas M. *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC biology* 2013;11:61.
7. Parlesak A, Schafer C, Schutz T, Bode JC, Bode C. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol* 2000;32:742-7.
8. Mathurin P, Deng QG, Keshavarzian A, Choudhary S, Holmes EW, Tsukamoto H. Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin in rats. *Hepatology* 2000;32:1008-17.
9. Rao R. Endotoxemia and gut barrier dysfunction in alcoholic liver disease. *Hepatology* 2009;50:638-44.
10. Chen P, Starkel P, Turner JR, Ho SB, Schnabl B. Dysbiosis-induced intestinal inflammation activates TNFRI and mediates alcoholic liver disease in mice. *Hepatology* 2014.
11. Keshavarzian A, Farhadi A, Forsyth CB, Rangan J, Jakate S, Shaikh M, Banan A, Fields JZ. Evidence that chronic alcohol exposure promotes intestinal oxidative stress, intestinal hyperpermeability and endotoxemia prior to development of alcoholic steatohepatitis in rats. *J Hepatol* 2009;50:538-47.
12. Elamin EE, Masclee AA, Dekker J, Jonkers DM. Ethanol metabolism and its effects on the intestinal epithelial barrier. *Nutrition reviews* 2013;71:483-99.
13. Kirpich IA, Solovieva NV, Leikhter SN, Shidakova NA, Lebedeva OV, Sidorov PI, Bazhukova TA, Soloviev AG, Barve SS, McClain CJ, Cave M. Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study. *Alcohol* 2008;42:675-82.
14. Bode JC, Bode C, Heidelberg R, Durr HK, Martini GA. Jejunal microflora in patients with chronic alcohol abuse. *Hepato-gastroenterology* 1984;31:30-4.
15. Chen Y, Yang F, Lu H, Wang B, Lei D, Wang Y, Zhu B, Li L. Characterization of fecal microbial

- communities in patients with liver cirrhosis. *Hepatology* 2011;54:562-72.
16. Mutlu EA, Gillevet PM, Rangwala H, Sikaroodi M, Naqvi A, Engen PA, Kwasny M, Lau CK, Keshavarzian A. Colonic microbiome is altered in alcoholism. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 2012;302:G966-78.
17. Yan AW, Fouts DE, Brandl J, Starkel P, Torralba M, Schott E, Tsukamoto H, Nelson KE, Brenner DA, Schnabl B. Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology* 2011;53:96-105.
18. Llopis M, Cassard-Doulcier AM, Wrzosek L, Bosch L, Bruneau A, Ferrere G, Puchois V, Martin J, Lepage P, Le Roy T, Lefefèvre L, Langelier B, Cailleux F, Gonzalez-Castro A, Rabot S, Gaudin F, Agostini H, Prévot S, Berrebi D, Ciocan C, Jousse C, Naveau S, Gerard P, Perlemuter G. Intestinal microbiota contributes to individual susceptibility to alcoholic liver disease. *Gut* accepted.
19. Bajaj JS, Heuman DM, Hylemon PB, Sanyal AJ, White MB, Monteith P, Noble NA, Unser AB, Daita K, Fisher AR, Sikaroodi M, Gillevet PM. Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. *Journal of hepatology* 2014;60:940-7.
20. Qin N, Yang F, Li A, Prifti E, Chen Y, Shao L, Guo J, Le Chatelier E, Yao J, Wu L, Zhou J, Ni S, Liu L, Pons N, Batto JM, Kennedy SP, Leonard P, Yuan C, Ding W, Hu X, Zheng B, Qian G, Xu W, Ehrlich SD, Zheng S, Li L. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature* 2014;513:59-64.
21. Bull-Otterson L, Feng W, Kirpich I, Wang Y, Qin X, Liu Y, Gobejishvili L, Joshi-Barve S, Ayvaz T, Petrosino J, Kong M, Barker D, McClain C, Barve S. Metagenomic analyses of alcohol induced pathogenic alterations in the intestinal microbiome and the effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG treatment. *PLoS One* 2013;8:e53028.
22. Forsyth CB, Farhadi A, Jakate SM, Tang Y, Shaikh M, Keshavarzian A. *Lactobacillus* GG treatment ameliorates alcohol-induced intestinal oxidative stress, gut leakiness, and liver injury in a rat model of alcoholic steatohepatitis. *Alcohol* 2009;43:163-72.
23. Tomas J, Langella P, Cherbuy C. The intestinal microbiota in the rat model: major breakthroughs from new technologies. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* 2012;13:54-63.
24. Gustot T, Lemmers A, Moreno C, Nagy N, Quertinmont E, Nicaise C, Franchimont D, Louis H, Deviere J, Le Moine O. Differential liver sensitization to Toll-like receptor pathways in mice with alcoholic fatty liver. *Hepatology* 2006;43:989-1000.
25. Ki SH, Park O, Zheng M, Morales-Ibanez O, Kolls JK, Bataller R, Gao B. Interleukin-22 treatment ameliorates alcoholic liver injury in a murine model of chronic-binge ethanol feeding: role of signal transducer and activator of transcription 3. *Hepatology* 2010;52:1291-300.
26. Dongowski G, Lorenz A, Proll J. The degree of methylation influences the degradation of pectin in the intestinal tract of rats and in vitro. *The Journal of nutrition* 2002;132:1935-44.
27. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojarvi J, Kootte RS, Bartelsman JF, Dallinga-Thie GM, Ackermans MT, Serlie MJ, Oozeer R, Derrien M, Druesne A, Van Hylckama Vlieg JE, Bloks VW, Groen AK, Heilig HG, Zoetendal EG, Stroes ES, de Vos WM, Hoekstra JB, Nieuwdorp M. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology* 2012;143:913-6 e7.
28. Willing BP, Vacharaksa A, Croxen M, Thanachayanont T, Finlay BB. Altering host resistance to infections through microbial transplantation. *PLoS One* 2011;6:e26988.
29. Bigorgne AE, Bouchet-Delbos L, Naveau S, Dagher I, Prevot S, Durand-Gasselin I, Couderc J, Valet P, Emilie D, Perlemuter G. Obesity-induced lymphocyte hyperresponsiveness to chemokines: a new mechanism of Fatty liver inflammation in obese mice. *Gastroenterology* 2008;134:1459-69.

## Supplemental materiel

### Inhibition of hepatic alcohol toxicity by correcting intestinal dysbiosis in mice

#### Methods

*Mice.* Female C57BL/6J were purchased from Janvier laboratory (Le Genest, France). Animals were kept in humidity and temperature-controlled rooms, and kept on a 12-hour light-dark cycle in 2 separate animal facilities. Resistant mice (res) were in one animal facility whilst sensitive mice (sens) in the other one. Mice had access to chow diet and water ad libitum before the study, in the 2 animal facilities. During the protocol of alcoholization water was added to the semi-liquid Lieber DeCarli diet. To avoid any stress to mice, a piece of wood is given to the mice so they can gnaw on it.

*Chronic exposure to ethanol.* Eight-week old mice were fed for 21 days with a liquid diet adapted from Lieber DeCarli, as described by Gustot and al.<sup>1</sup>, Ki and al.<sup>2</sup> and based on the NIAAA model<sup>3</sup>. Briefly, the ethanol diet was obtained by adding absolute ethanol to a solution of a Lieber DeCarli powder (ssniff, Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) in filtered water. After a 7-day adaptation to the animal facility and a 7-day adaptation to the semi-liquid diet, mice were given increasing ethanol concentrations for 7 days (1% increase every two days). The final concentration of ethanol in this liquid diet was 5% (vol/vol), such that ethanol accounted for 28% of the total caloric intake. The control diet was obtained by replacing the ethanol by an isocaloric amount of maltodextrin (Maldex 150, safe, France). Alcoholized groups were allowed free access to the 5% (vol/vol) ethanol diet for 7 days. Control mice were pair-fed

with the isocaloric control diet throughout the entire feeding period.

During the Lieber DeCarli diet, animals did not have access to drinking water. 3 independent experiments were performed with different number of animals but same treatments, in 2 different animal facilities. Microbiota transfer was realized by feces gavage by adapting protocol previously described<sup>4</sup>. Feces, coming from 20 resistant mice, were recovered, resuspended in transfer buffer (Dulbecco's phosphate buffered saline solution, Gibco, Saint-aubin, France) and a 100 µl volume containing 3.33 mg of feces was administered to each sensitive mouse once every 2 days for 21 days. An alternative Lieber DeCarli diet containing 6.5% pectin from apple (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) was given to mice in animal facility B. Body weight was measured weekly for each experiment and food intake once every 2 days.

*Tissues and samples.* Mice were anesthetized and blood samples were collected in EDTA coated tubes. Then, the livers were perfused inversely to the normal flux with PBS/EDTA (5 mM). After removing blood, livers were excised, weighed and either fixed in buffered formaldehyde or snap-frozen in liquid nitrogen for TG and RNA extractions. All samples were stored at -80°C until use. The serum was use for liver alanine aminotransferase (ALT) determination (Olympus, AU400). Proximal ileum and colon were cut in two pieces, one piece was fixed in buffered formaldehyde and the other one was stored at -80°C until



extraction. Fecal samples were collected from mice fed with ethanol diet from the two different animal facilities, four days after mice reception and immediately before euthanasia, and fixed as previously described<sup>5</sup>.

*Measurement of liver triglycerides.* Portions of frozen liver from mice were homogenized in chloroform-methanol (2 :1) in order to extract total lipids and triglycerides (TGs) were separated by thin layer chromatography. TGs were extracted from the silica plate with acetone, measured with a colorimetric diagnostic kit (Triglycerides FS; Diasys) and expressed in mg of triglycerides per milligram of liver. Liver alanine aminotransferase (ALT) activity in serum was assayed by a spectrophotometric method (Olympus, AU400).

*Liver and gut histology.* Liver and gut (ileum, colon) were fixed overnight in 4% paraformaldehyde and then embedded in paraffin. Paraffin sections (4 µm thick) were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Immunohistochemical staining was done with paraffin sections using Abs against : Mucin 2 (H-300) (SC-15334, Santa Cruz Biotechnology, Tébu-bio SAS, France). The sections were washed and incubated with an appropriate biotinylated secondary Ab and then with streptavidin-horseradish peroxidase complex (LSAB kit, Dako France, Trappes, France). Sections were then counterstained with hematoxylin. Negative controls involved following the same procedure with omission of the primary Ab. Images were obtained using a Leica DMLA microscope (Leica Microsystems) equipped with Fluotar optic objectives, at the indicated magnification, and were digitized directly with a Leica camera DFC 450C and kit software.

Liver steatosis was assessed semi-quantitatively into five grades: none = 0; mild = 1 (1% to 5% of hepatocytes); moderate = 2 (6% to 32%); marked = 3 (33% to 66%); and severe = 4 (67% to 100%). Goblets cells producing mucin were counted along 10 villusities after muc2 immunohistochemistry.

*Reverse transcription of RNA.* Mice livers were disrupted in Qiazol solution. Total RNA was extracted using a Qiagen RNeasy Lipid tissue minikit (Qiagen, Valencia, Canada). RNA integrity was determined with the Agilent bioanalyzer 2100 system with the RNA 6000 Nano Labchip kit. Samples with an RNA integrity inferior to 8 were eliminated. For cDNA synthesis, 1 µg of each total RNA sample was reverse transcribed. A 12 µl mix containing 1 µg of RNA, random hexamers (Roche Diagnostics, Meylan, France), and 10 mM dNTP Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA) was prepared for each sample. Mixtures were heated at 65°C for 5 minutes and cooled on ice, and then a 8 µl reaction mix containing 1 µl of M-MuLv RT (Invitrogen), 4 µl of 5x Buffer (Invitrogen), 2 µl of 0.1 M dithiothreitol (Invitrogen), and 1 µl of Protector RNase Inhibitor (40 U/µl; Invitrogen) was added. The reaction conditions were 10 minutes at 25°C, 50 minutes at 50°C, 15 minutes at 70°C.

*Gene expression analysis by quantitative PCR.* Real-time qPCR was performed in a Light Cycler 480 (Roche Diagnostics) using the LC FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics). Amplification was initiated with an enzyme activation step at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles consisting of 20 seconds of denaturation at 95°C, 15 seconds of annealing at the temperature appropriate for each primer, and 10 seconds of elongation at

72°C. We amplified the cDNAs for 18S, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  and CCL-2 (Supplemental Table 2). Primer sequences are listed in the supplemental Table 2. Data were analyzed using LC 480 Software (Roche Diagnostics). The relative genes expression were normalized to the 18S reference gene.

*Analysis of the gut microbiota by FISH.* Microbiota composition was analyzed by Fluorescent in Situ Hybridization combined with Flow Cytometry (FISH-FCM). A set of 9 probes targeting bacterial 16S rRNA were used to assess the relative proportion of intestinal bacteria phylogenetic groups *Clostridium coccoides*, *Bacteroides*, *Clostridium leptum*, *Atopobium*, *Enterobacteria*, *Lactobacillus-Enterococcus*, *Bifidobacterium*, and Mouse Intestinal Bacteria. Fluorescent in situ hybridization combined with flow cytometry was performed as described previously <sup>6</sup>.

*Analysis of the gut microbiota by 16s Ribosomal RNA sequencing.* Microbiota composition was analyzed using illumina MiSeq technology targeting the 16S ribosomal DNA V3-V4 region in paired-end modus (2 x 300 base pair) (GenoToul, Toulouse). Bacterial DNA were obtained by homogenization of stools by using a Guanidinium thiocyanate containing lysis buffer in a Fast Prep homogenizer. Successive steps of purification and precipitation by using "Laboratory-made" buffers allow to extract bacterial DNA with a high quality. PCR were performed to prepare amplicons by using V3-V4 oligonucleotides (V3fwd: 5' TACGGRAGGCAGCAG 3', V4rev: 5' GGACTACCAGGGTATCTAAT 3'). The quality of amplicons were checked by gel electrophoresis migration and send to the GenoToul platform for sequencing.

The resulting paired reads were assembled using PANDaseq v 2.7 to generate an amplicon size of 450 base pairs<sup>7</sup>. Sequences were processed by the quantitative insights into microbial ecology (QIIME v1.9.0) pipeline using default parameters<sup>8</sup>. The mean number of quality controlled reads was 46,852  $\pm$  17,409 (mean  $\pm$  SD) per mice. Assembled reads were demultiplexed and processed by the quantitative insights into microbial ecology (QIIME v1.9.0) pipeline using the default parameters of QIIME<sup>8</sup>. Chimeric sequences were identified *de novo* and reference based and then removed using usearch61<sup>9</sup>. The non-chimeric sequences were then clustered into operational taxonomic units (OTUs) at 97.0% sequence similarity using a closed reference-based picking approach with UCLUST software against Greengenes database 13\_8 of bacterial 16S rDNA sequences<sup>10</sup>. After rarefaction at 19,000 reads per sample, bacterial alpha diversity was estimated using Chao1, Shannon and Phylogenetic diversity whole tree index. OTUs with a prevalence <5% were removed from the analysis. Analyses using R software v2.14.1 were restricted to merged OTUs with the same taxonomic assignment. Results are represented as mean $\pm$ SEM. Wilcoxon test was applied to assess statistical significance in bacterial composition between the different samples. Based on inter-class PCoA, statistical p-values of the link between the different mice groups and bacterial microbial profiles was assessed using an ANOSIM test (1000 permutations). I use a correction of the p-value. You can use FDR-p value <5% as a threshold and present the non corrected p-value. (p<0,05 was significant).

**Supplemental tables****Supplemental Table 1. Composition of the modified Lieber DeCarli diet.**

<b>Ingredients</b>	<b>g/L</b>
Casein (100 Mesh)	41.4
L-Cysteine	0.5
DL-Methionine	0.3
Corn Oil	39.6
Maltose Dextrin	25.6
Cellulose	10.0
Salt Mix	8.75
Vitamin Mix	2.5
Choline Bitartrate	0.53
Xanthan Gum	3.0

Ethanol was added at the increasing concentrations as described in supplemental section.

**Supplemental table 2 : Primer sequences used for q-PCR reactions.**

Name	5'- Forward - 3'	5'- Reverse - 3'
18S	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
TNF- $\alpha$	ACGTCGTAGCAAACCACC-AA	ATAGCAAATCGGCTGACGGT
IL-6	GTTCTCTGGGAAATCGTGGA	TGTACTCCAGGTAGCTATGG
IL-10	TTTGAATTCCTGGGTGAGAA	ACAGGGGAGAAATCGATGACA
TGF- $\beta$	GCAACATGTGGAACCTACCAGAA	GACGTCAAAAGACAGCCACTCA
IL-1 $\beta$	AGCTTCAGGCAGGCAGTATC	TGGTGATGATGCCGTGTTCT
CCL-2	AGGTCCCTGTCATGCTTCTG	TCTGGACCCATTCCTTCTTG

**Supplemental table 3. Nomenclature, sequences and targets of probes used for fluorescent in situ hybridization. \*Y = C/T and W = A/T**

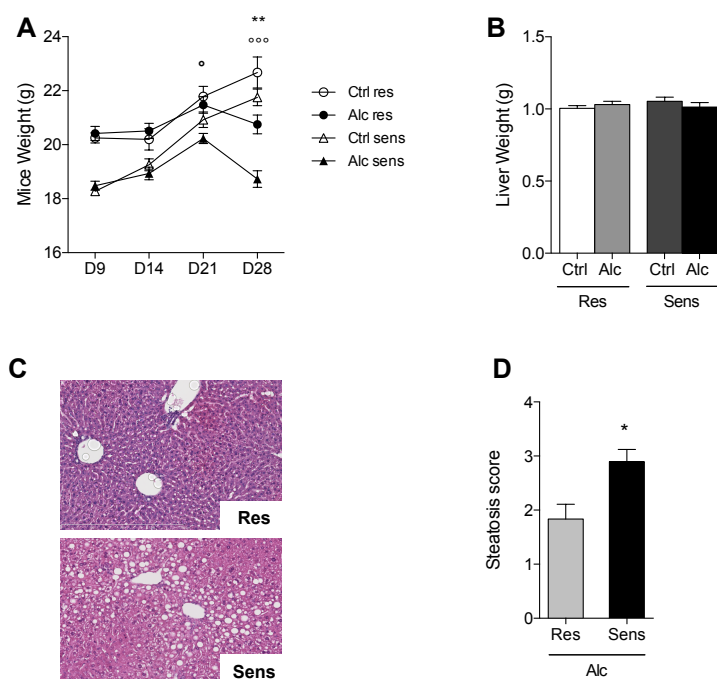
<b>Probe name</b>	<b>Sequence (5' * 3')</b>	<b>Target</b>	<b>F</b>
NON EUB 338	ACATCCTACGGGAGGC	none	5'FITC
NON EUB 338	ACATCCTACGGGAGGC	none	5'CY5
EUB 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	domain Bacteria	5'FITC
EUB 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	domain Bacteria	5'CY5
Bif164	CATCCGGCATTACCACCC	<i>Bifidobacterium</i> genus	5'CY5
Bac303	CCAATGTGGGGGACCTT	<i>Bacteroides-Prevotella</i> group	5'CY5
Lab158	GGTATTAGCAYCTGTTTCCA	<i>Lactobacillus-Lactococcus-Enterococcus</i> group	5'CY5
Clep 866	GGT GGA TWA CTT ATT GTG Competitor 1 GGT GGA AWA CTT ATT GTG Competitor 2 GGT GGA TWAV CTT ATT GCG	<i>Clostridium leptum</i> subgroup	5'CY5
Ato 291	GGTCGGTCTCTCAACCC	<i>Atopobium</i> cluster and <i>Coriobacterium</i> group	5'CY5
Enter 1432	CTTTTGCAACCACT	Enterobacteria	5'CY5
Erec 482	GCTTCTAGTCAGGTACCG	<i>Clostridium coccoides</i> group	5'CY5
Ecy1 387	CGCGGCATTGCTCGTTCA	Erysipelotrichi	5'CY5
MIB 661	GCAATCCGCATACTTCTC	mouse intestinal Bacteria	5'CY5

## REFERENCES

1. Gustot T, Lemmers A, Moreno C, et al. Differential liver sensitization to Toll-like receptor pathways in mice with alcoholic fatty liver. *Hepatology* 2006;43:989-1000.
2. Ki SH, Park O, Zheng M, et al. Interleukin-22 treatment ameliorates alcoholic liver injury in a murine model of chronic-binge ethanol feeding: role of signal transducer and activator of transcription 3. *Hepatology* 2010;52:1291-300.
3. Bertola A, Mathews S, Ki SH, et al. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). *Nature protocols* 2013;8:627-37.
4. Willing BP, Vacharaksa A, Croxen M, et al. Altering host resistance to infections through microbial transplantation. *PLoS One* 2011;6:e26988.
5. Gerard P, Brezillon C, Quere F, et al. Characterization of cecal microbiota and response to an orally administered lactobacillus probiotic strain in the broiler chicken. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 2008;14:115-22.
6. Le Roy T, Llopis M, Lepage P, et al. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* 2012.
7. Masella AP, Bartram AK, Truszkowski JM, et al. PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. *BMC Bioinformatics* 2012;13:31.
8. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010;7:335-6.
9. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 2010;26:2460-1.
10. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:5069-72.

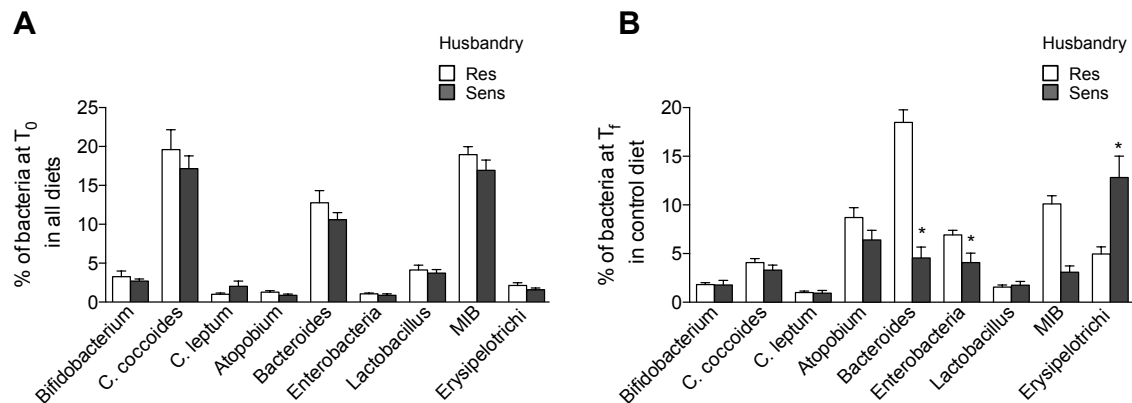
## Supplemental figure

**Supplemental Figure 1**



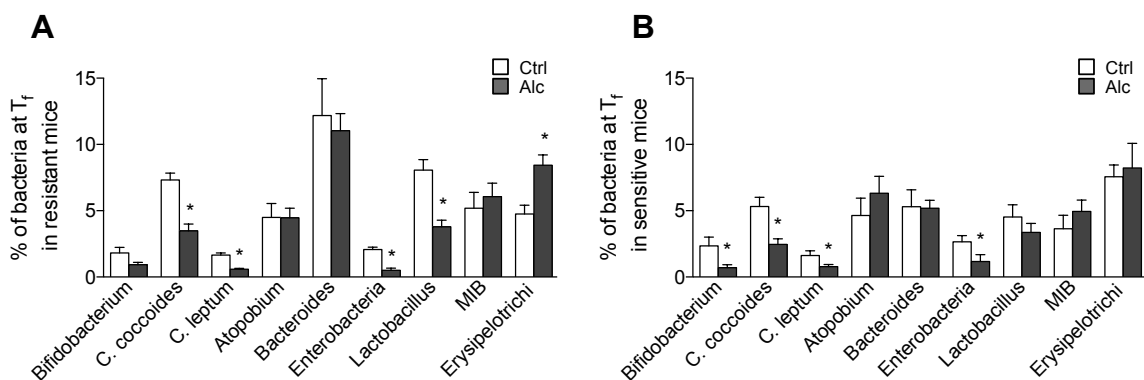
**Supplemental Figure 1: Mice weight and liver phenotype.** Mice were alcoholized in two different animal houses. (A) mice weight, ° Sens Ctrl vs Sens Alc, \*Res Ctrl vs Res Alc, (B) liver weight, (C) Representative micrographs of markedly steatosis in alcohol resistant mice (upper panel) compared to the alcohol sensitive mice (lower panel), (D) semi-quantification of steatosis \*Ctrl res vs Alc res, °Ctrl sens vs Alc sens.\*°: p<0.05, °°, p<0.0001. Ctrl res n=8; Alc res n=12; Ctrl sens n=18; Alc sens n=21.

## Supplemental Figure 2



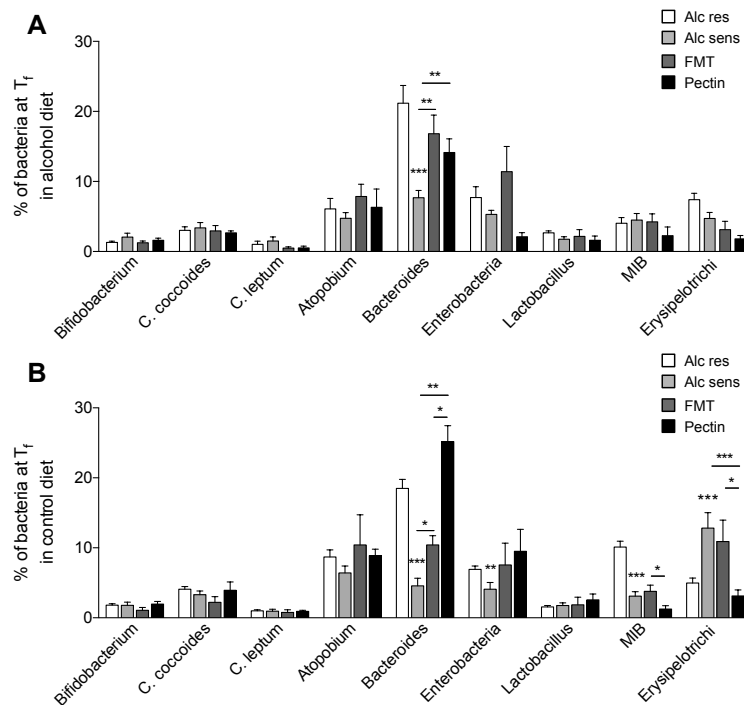
**Supplemental Figure 2: Relative abundance of bacteria before and after Lieber DeCarli diet.** (A) Comparison of IM between mice in both animal facilities (A and B) before Lieber DeCarli adaptation and alcohol (T<sub>0</sub>), (B) comparison of IM between resistant and sensitive mice consuming the control diet (T<sub>f</sub>). \*Ctrl res vs Alc res. \*:p<0.05. Ctrl res n=8 ; Alc res n=11 ; Ctrl sens n=16 ; Alc sens n=10.

## Supplemental Figure 3



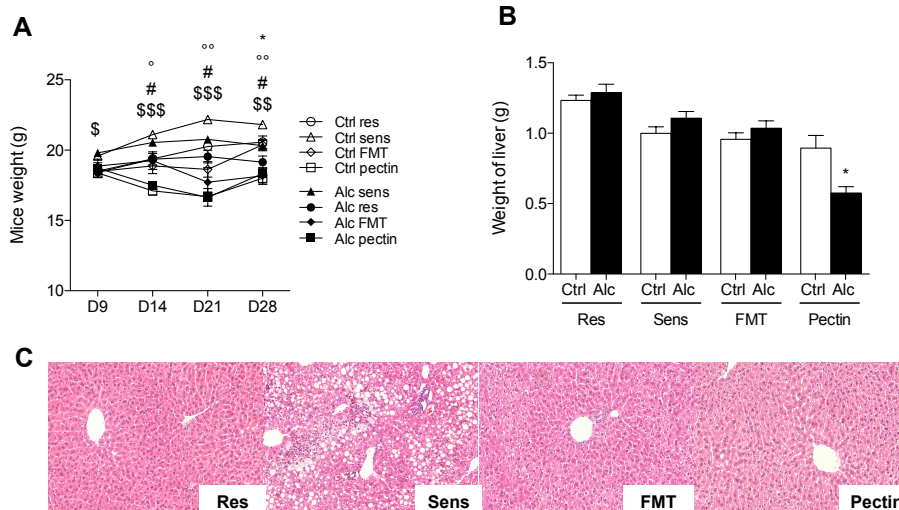
**Supplemental Figure 3: Relative abundance of bacteria in control or alcohol resistant and sensitive mice.** (A) comparison of IM between control and alcohol resistant mice, (B) in sensitive mice. \*Ctrl res vs Alc res. \*:p<0.05. Ctrl res n=8 ; Alc res n=11 ; Ctrl sens n=16 ; Alc sens n=10.

# Supplemental Figure 4



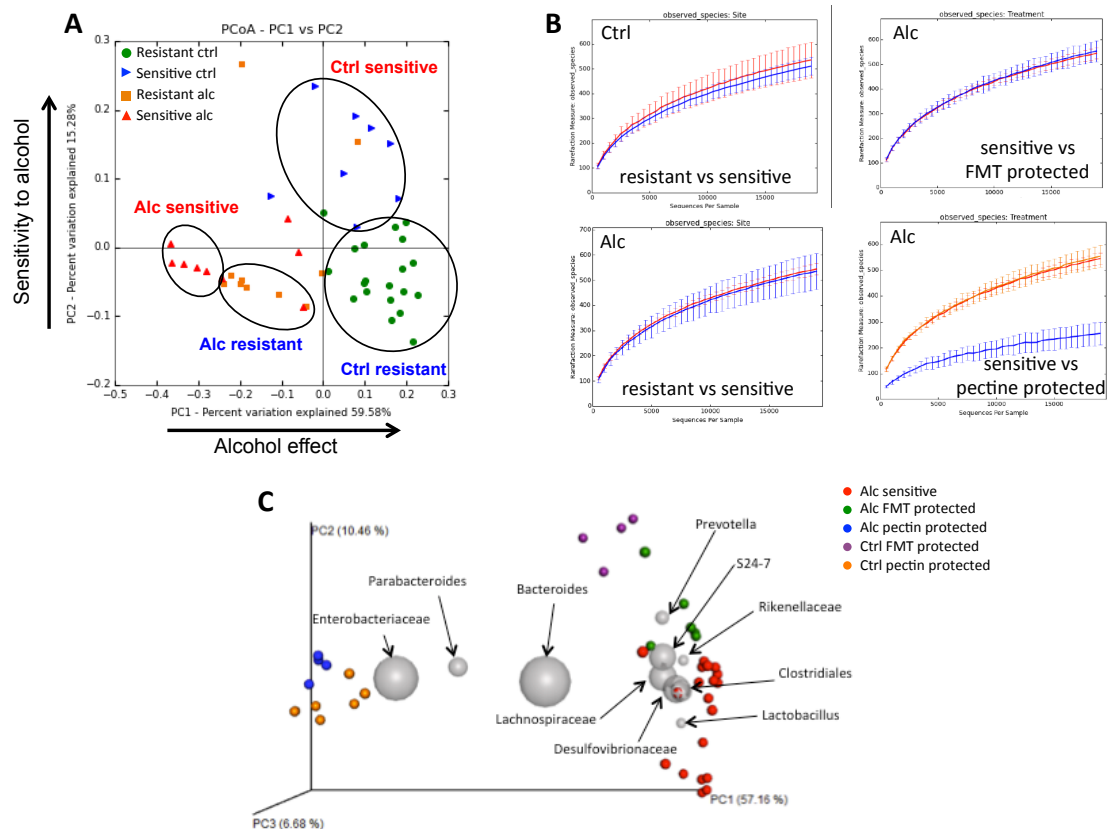
**Supplemental Figure 4: Relative abundance of bacteria after fecal microbial transfer or pectin treatment.** (A) Relative abundance of bacteria in alcohol groups of resistant or sensitive mice, and sensitive mice treated by fecal microbial transfer (FMT) or pectin, (B) control groups. \*Ctrl res vs Alc res, °Ctrl sens vs Alc sens. \*:  $p < 0.05$ , °:  $p < 0.005$ , \*\*\*:  $p < 0.0001$ . Ctrl res  $n=5$ ; Alc res  $n=16$ ; Ctrl sens  $n=9$ ; Alc sens  $n=8$ ; Ctrl FMT  $n=4$ ; Alc FMT  $n=7$ ; Ctrl pectin  $n=6$ ; Alc pectin  $n=4$ .

# Supplemental Figure 5



**Supplemental Figure 5: Mice weight and liver phenotype after fecal microbiota or pectin treatment.** (A) body weight mice under control or alcohol diet in resistant, sensitive, FMT and pectin mice. \*, °, #, \$:  $p < 0.05$ , °°, °°°, \$\$\$:  $p < 0.005$ , \$\$\$\$:  $p < 0.0001$ . \*Ctrl res vs Alc res, ° Ctrl sens vs Alc sens, # Alc sens vs Alc FMT, \$ Alc sens vs Alc pectin. (B) liver weight, (C) Representative micrographs of markedly steatosis in resistant, sensitive, FMT treated and pectin treated mice under alcohol diet. Ctrl res  $n=20$ ; Alc res  $n=10$ ; Ctrl sens  $n=8$ ; Alc sens  $n=10$ ; Ctrl FMT  $n=4$ ; Alc FMT  $n=7$ ; Ctrl pectin  $n=7$ ; Alc pectin  $n=4$ .

## Supplemental Figure 6



**Supplemental Figure 6: Impact of alcohol, fecal microbiota transfer (FMT) and pectin on microbiota.** (A) Unweighted unifrac coords 2D PCoA performed in resistant and sensitive mice fed LDC control or LDC-alcohol, Axis 1, percent variation explained 59.88 % and axis 2, percent variation explained 15.28 %. Each mice group is represented by a color code (alcohol-resistant mice on control diet, green circle ; alcohol-resistant mice on alcohol diet, orange square ; alcohol-sensitive mice on control diet, blue triangle and alcohol-sensitive mice on alcohol diet, red triangle, ( $p < 0.05$ ,  $R = 0.70$ , ANOSIM test), (B) Comparison of the alpha-diversity in resistant and sensitive mice depending on alcohol or FMT or pectin treatments, (C) Unweighted unifrac biplot illustrating the relative degree that clusters sensitive and protected mice with (Alc) or without alcohol (Ctrl). The size of the sphere for each taxon is proportional to the mean relative abundance of that taxon across all samples. The five most abundant genus were represented.

### II.3. Résultats complémentaires et discussion

Ce travail a mis en évidence qu'à consommation égale d'alcool, les souris ne répondaient pas de la même manière à l'alcool, certaines étant sensibles aux lésions hépatiques induites par l'alcool, tandis que d'autres étaient résistantes. Une diminution significative des *Bacteroides* a été observée chez les souris sensibles à l'alcool. Cette dysbiose intestinale a été associée aux lésions hépatiques de la MAF mais aussi à une altération de la barrière intestinale avec une diminution du nombre de cellules à mucus. Pour confirmer cette relation entre dysbiose et lésions, deux traitements ont été utilisés afin de corriger la diminution des *Bacteroides* et ainsi prévenir l'apparition des lésions : un traitement par FMT ou un traitement par prébiotique, la pectine.

La pectine est une fibre contenue dans les végétaux, dont les fruits comme la pomme, et induit la prolifération de certaines populations bactériennes. En effet, il est connu que la pectine a un effet positif sur la croissance de différents *Bacteroides*, mais aussi de *Faecalibacterium prausnitzii*, de *Lactobacillus* et/ou de *Bifidobacteria* (263). Par ailleurs, une tendance à la diminution des populations de *Clostridium* a été noté quand on ajoute de la pectine au régime (264). La pectine est métabolisée par *Faecalibacterium prausnitzii* en butyrate tandis que *Bacteroides thetaiotaomicron* la métabolise en acétate et succinate (263). Des travaux récents dans un modèle murin ont montré que la pectine ajoutée au régime alcoolisé permettait de prévenir les lésions hépatiques, et donc que la pectine induisait des modifications du MI qui ont un impact sur la MAF. Cependant, ces travaux ne mettaient pas en relation les populations bactériennes, la pectine et les lésions hépatiques (265).

Dans notre étude, nous confirmons que la pectine et la FMT sont efficaces pour maintenir des proportions élevées de *Bacteroides*. Ce maintien est suffisant pour prévenir l'apparition des lésions hépatiques après une alcoolisation.

Suite à ces résultats, nous avons entrepris d'identifier plus précisément les espèces associées à cette protection face à la toxicité de l'alcool en séquençant le gène codant l'ARN 16S bactérien des bactéries présentes dans le caecum.

Nous avons, en attendant ces résultats, réalisé des cultures de *Bacteroides thetaiotaomicron* en présence d'alcool.



En effet, nous avons observé que le nombre de cellules à mucus au niveau colique était diminué suite à l'alcoolisation et d'autant plus que les souris présentaient des lésions hépatiques. De plus, la FMT comme la pectine permettaient de restaurer ce nombre. Il était décrit que la différenciation des cellules à mucus est en partie dépendante de *Bacteroides thetaiotaomicron* et nous avons donc évalué *in vitro* les effets de l'alcool et de la pectine sur la prolifération de cette bactérie (266). Cette étude a été menée en collaboration avec une équipe de l'INRA (équipe de Muriel Thomas, MICALIS). Les résultats préliminaires montrent un effet de l'alcool sur la croissance de *B. thetaiotaomicron* dépendant de la quantité. Des expériences complémentaires doivent être effectuées pour voir l'effet de la pectine sur la croissance de *B. thetaiotaomicron* en présence ou non d'alcool.

Afin d'étayer les données prouvant une atteinte de la barrière intestinale, d'autres paramètres sont actuellement évalués. La barrière intestinale est maintenue grâce à un ensemble de protéines impliquées dans les jonctions serrées entre les cellules épithéliales. Parmi ces protéines on retrouve la famille des claudines, l'occludine ou encore ZO-1 (pour l'anglais *Zona Occluden 1*). Il est déjà établi que dans la MAF, la barrière intestinale est altérée, notamment au niveau de ces jonctions serrées. En effet, des études ont montré que chez des rats alcoolisés et des patients alcooliques, la répartition des occludines et ZO-1 est modifiée (267, 268). Par ailleurs, les claudines 1, 3 et 4 (269) ont été associées à la diminution de la perméabilité intestinale. Ces données sont en cours d'acquisition au sein des différents groupes de souris alcoolisées et traitées. Par ailleurs, l'intégrité de la barrière intestinale peut-être altérée par des contacts plus directs entre le MI et l'épithélium même.

Nous avons déjà des données prouvant que le nombre de cellules à mucus est diminué par l'alcool, en particulier chez les souris développant des lésions hépatiques. La FMT comme la pectine restaure un nombre de cellule à mucus normal.

Les peptides anti-microbiens sont également produits au niveau du tube digestif pour éviter ces interactions directes. Des études, en particulier dans les maladies du tube digestif, ont décrit qu'une diminution de la production de ces peptides, en particulier Reg III- $\gamma$ , participait à l'altération de la barrière intestinale (270). Nous quantifions également ces peptides anti-microbiens.

Ces résultats sont des pistes importantes pour identifier quels sont les effets directs de l'alcool ou la pectine sur la croissance des bactéries que nous avons identifiées comme bénéfiques. La suite de ce travail permettra d'identifier les mécanismes par lesquels ces bactéries interviennent dans la protection des lésions hépatiques. Il est important aussi de faire ces études sur d'autres populations de *Bacteroides*, mais aussi sur les bactéries identifiées comme délétères. Ces résultats permettraient une meilleure compréhension de l'implication des bactéries commensales dans la protection ou l'aggravation de la MAF.

Le séquençage 16S a permis de réaliser des analyses plus détaillées des bactéries modifiées au cours de l'alcoolisation et des différents traitements. Ces analyses montrent que l'alcool induit des modifications du microbiote que les souris soient résistantes ou sensibles à la toxicité de l'alcool. Ceci est totalement cohérent dans la mesure où l'alcool est un substrat extrêmement spécifique et va favoriser la croissance de bactéries spécifiques. L'analyse en composante principale permet également de mettre en évidence que le MI est clairement différent chez les souris sensibles et résistantes. Cependant, ces modifications n'affectent pas la diversité bactérienne. De plus l'analyse des phyla a confirmé les résultats obtenus en FISH selon lesquels les *Bacteroidetes* sont diminués chez les souris sensibles.

Le transfert de microbiote de souris résistantes à des souris sensibles permet de modifier le MI dont le contenu va se rapprocher du MI des souris résistantes donneuses. Ces données sont extrêmement intéressantes. En effet, nos transferts de fèces ont été réalisés sur des souris conventionnelles ayant leur propre MI et non sur des souris axéniques. Afin d'éviter que le MI de la souris receveuse ne revient à son état premier, nous avons réalisé des transferts de MI des souris donneuses aux souris receveuses de manière récurrente (3 fois par semaine). Nos données permettent de prouver que ce transfert de MI chronique, qui pourrait se rapprocher d'un traitement par des probiotiques, est suffisant pour contrôler le MI.

La pectine, quant à elle, entraîne une modification drastique du MI. On observe en particulier une augmentation très importante des *Enterobacteria*. Les analyses en composante principale montrent par ailleurs que cet effet de la pectine est dominant par rapport aux effets de l'alcool et que la pression de ce substrat sur la prolifération bactérienne est majeure.

Les effets particulièrement excessifs de la pectine, compte tenu en particulier des pourcentages élevés utilisés dans le régime, obligent à considérer que des proportions plus faibles seront à utiliser. En effet, les modifications observées sur le MI suite au traitement par la pectine obligent à parler de dysbiose plutôt que de restauration du MI, et nécessiteraient de considérer son impact sur l'animal à long terme.

Nos résultats ont prouvé que la sensibilité des souris face aux lésions hépatiques induites par l'alcool est due au moins en partie au MI. Le contrôle du MI par un transfert de MI ou par des fibres, la pectine, permet de restaurer une protection hépatique vis à vis de la toxicité alcoolique.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**



Mon travail de thèse avait pour but de clarifier certains mécanismes impliqués dans l'évolution de la Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) et de la Maladie Alcoolique du Foie (MAF).

Dans la NALFD, mon travail consistait à prouver que la cellule de Kupffer jouait un rôle clé dans les étapes précoces de la pathologie, en particulier dès le stade de la stéatose. Les résultats que nous avons obtenus sur la KC permettent effectivement de mieux comprendre son rôle dans la NASH. Nous avons en particulier prouvé que le métabolisme lipidique est fortement perturbé dans la KC lors de la stéatose. Si l'accumulation de lipides dans l'hépatocyte au cours de la NAFLD est un fait acquis depuis longtemps, le stockage de lipides dans la KC n'était pas prouvé. Nous avons par ailleurs démontré que cette dérégulation avait, au moins en partie, un rôle causal dans le profil pro-inflammatoire des KC et que celui-ci pouvait être contrôlé par un inhibiteur de la lipogenèse. Ainsi, il pourrait être intéressant d'inhiber ce métabolisme lipidique exacerbé spécifiquement dans la KC. Nous avons mené des études préliminaires dans ce sens, en utilisant des nanoparticules chargées en siRNA dirigés contre la FAS ou la SPT, et les premiers résultats laissent penser que le ciblage de la KC est une piste prometteuse.

Nos travaux sur la NAFLD se sont dirigés sur l'impact du fructose dans l'aggravation des lésions hépatiques. En effet, les publications encore rares sur le sujet mettaient en évidence un rôle néfaste du fructose alors même que son taux d'utilisation dans l'alimentation quotidienne avait largement augmenté. Les études que nous avons réalisées sur nos modèles murins ont fourni des résultats auxquels nous ne nous attendions pas forcément. En effet, nous avons montré que le fructose associé à un régime hyperlipidique aggravait bien les lésions hépatiques ainsi que la sensibilité au glucose. Par contre nous avons montré que contrairement à notre étude précédente, les KC n'étaient pas activées malgré un recrutement lymphocytaire augmenté.

Afin de comprendre quels mécanismes pouvaient expliquer ces différences, nous avons analysé la composition du microbiote intestinal, grand fournisseur d'activateurs des KC comme cette thèse a pu vous le décrire. Les techniques d'analyse du microbiote que nous avons utilisé ont montré que les *Erysipelotrichi* semblent associer à la présence de fructose dans le régime. Hormis ces bactéries, les MIB (pour l'anglais *Mouse Intestinal Bacteria*), particulièrement absentes chez les souris sous régime hyperlipidique, voient leur niveau réaugmenté chez les souris ayant un régime hyperlipidique associé au fructose.

Ces proportions sont donc associées à une aggravation des lésions hépatiques mais ne permettent pas à l'heure actuelle de dire si elles ont un rôle causal dans cette aggravation. S'il y a une augmentation de cette population dans l'intestin en présence de fructose, cela pourrait lier cette population aux différences d'activation des cellules immunitaires et en particulier l'activation des KC.

Il est clair que la recherche de l'impact de l'alimentation sur les populations bactériennes du MI est très importante pour comprendre l'implication du MI sur l'obésité et ses complications dont la NAFLD. Notre équipe a pu montrer par ailleurs que le MI avait bien un rôle causal dans le développement des lésions hépatiques (237) mais les mécanismes par lesquels passent ces effets protecteurs ou, inversement, délétères sont encore largement incompris. De nombreuses études actuelles se focalisent sur la nature des métabolites produits par le MI qui ont un rôle de substrats pour nos cellules, de messagers ou de régulateurs. Récemment, le rôle des acides biliaires dans des maladies comme la NAFLD et dont le cycle entéro hépatique dépend du métabolisme du MI a été mis sur la sellette (271, 272).

Nos travaux sur le fructose ne font que mettre en exergue ces interactions complexes et représentent un travail relativement descriptif mais néanmoins pertinent. Nos études doivent désormais se focaliser sur des régimes extrêmement précis avec un contrôle du microbiote, peut-être par transfert de MI connu et contrôlé, afin de pouvoir, par des analyses poussées de métabolomiques et de protéomiques, clarifier les mécanismes protecteurs ou délétères. Compte tenu des données actuelles, il semble probable que s'intéresser à l'intégrité de la barrière intestinale et à son immunité sont pertinents puisqu'il y a clairement une association permanente entre la rupture de la barrière intestinale et la gravité de la NAFLD.

Au cours de nos travaux sur la MAF, notre but était principalement d'étudier les mécanismes impliqués dans la susceptibilité des individus face à la toxicité de l'alcool. Notre équipe avait mis en évidence la présence d'une dysbiose chez des patients ayant une consommation chronique d'alcool égale en quantité et en durée. Cette dysbiose était corrélée à la gravité des lésions hépatiques. En utilisant des souris axéniques, notre équipe avait montré que le MI avait bien un rôle causal dans la gravité des lésions hépatiques induites par l'alcool (Annexe 1,(273)).

En poursuivant ces travaux sur nos modèles murins, nous avons pu mettre en évidence que cette inégalité des individus vis à vis de la toxicité hépatique de l'alcool existait également chez les souris. Nous avons ainsi montré que les souris sensibles à l'alcool et développant des lésions hépatiques avaient un MI différent des souris résistantes et, entre autre, présentaient des taux de *Bacteroides* très bas. Nous avons ensuite prouvé que le contrôle du MI et le maintien en particulier des *Bacteroides* à un niveau élevé était suffisant pour protéger les souris de la toxicité hépatique de l'alcool.




Compte tenu de la plus grande facilité qu'il peut y avoir à utiliser un prébiotique comme la pectine, connue pour être un substrat des *Bacteroides*, nous avons essayé d'étayer nos résultats sur la pectine. Dans cette optique il est important de comprendre son action en fonction de la quantité utilisée. En effet, le passage du modèle murin à l'Homme nécessite certaines équivalences qui peuvent paraître surprenantes, tant au niveau de l'alcool consommé que la quantité de pectine à utiliser. Il faut notamment se remémorer que la souris est peu sensible à l'alcool et de ce fait, pour induire des lésions hépatiques, il faut des quantités d'alcool élevées. Afin de pallier à ces effets, le traitement à base de pectine est proportionnel à la quantité d'alcool donnée (figure 52).

<b>Equivalence</b>		
	<b>souris</b>	<b>homme</b>
<b>Poids</b>	18 g	70 kg
<b>Consommation par jour d'alcool à 5%</b>	12,5 ml	<b>48 L</b>
<b>Volume d'alcool pur par jour</b>	0,6 ml	2,4 L
<b>Quantité d'alcool pur par jour</b>	0,5 g	1,9 kg

	<b>souris</b>	<b>homme</b>
<b>Quantité de pectine utilisée pour diminuer les <i>Bacteroides</i></b>		
<b>Consommation par jour de pectine à 6,5%</b>	12,5 ml	<b>48 L</b>
<b>Pectine pure par jour</b>	0,8 g	<b>3,1 kg</b>

	<b>Equivalent en boisson</b>
 <b>Bière (5° pour 25 cL)</b>	48 L
 <b>Vin/champagne (12° pour 10 cL)</b>	19 L
 <b>Whisky (40° pour 3 cL)</b>	5,7 L

**Figure 52 : Equivalence alcool/pectine de la souris à l'Homme**

Le tableau du haut indique les quantités d'alcool utilisées chez la souris dans nos expériences et leur équivalence chez l'Homme. Leur équivalence en consommation d'alcool est indiquée dans le tableau de droite. Le tableau du bas indique les quantités de pectine utilisées dans nos expériences et leur équivalence.



Pour une souris, nous utilisons 0,5 g ( $6.10^{-4}$  L) d'alcool pur par jour pour induire des lésions hépatiques et le foie est protégé avec 0,8 g de pectine pure par jour. L'équivalence pour un Homme de 70 kg serait de 1,9 kg d'alcool pur (soit 2,4 L) , ce qui correspond à 5,7 L de whisky pur par jour ou 48 L de bière .... Et la quantité de pectine à ajouter pour un Homme équivaldrait par jour à 3 kg de pectine! Bien évidemment cette relation n'est pas à faire littéralement, mais il est clair que l'utilisation de la pectine qui a un fort pouvoir gélifiant ne peut se faire en trop grande quantité sans avoir des effets secondaires désagréables sur la digestion, en particulier, des ballonnements. Nos expériences préliminaires prouvent qu'une utilisation à 0,4 % de pectine dans nos modèles murins est suffisante pour moduler le MI est en particulier la baisse de *Bacteroides*. L'analyse des lésions hépatiques est en cours d'étude.

Dans le but de concevoir des traitements, outre les prébiotiques, développer des probiotiques pourrait être extrêmement intéressant.

Des traitements à base de bactéries bénéfiques (probiotiques) ont déjà été testés dans les hépatopathies. Une diminution croissante des *Lactobacillus* est associée à la sévérité de la stéatose au cours de la NAFLD (233, 234). Actuellement des traitements pour pallier cette diminution et par conséquent les lésions associées ont été rapportés, notamment avec *Lactobacillus casei shirota* (274 , 275). L'effet des *Lactobacillus* a également été étudié dans la MAF. L'administration du probiotique *Lactobacillus GG* réduit les caractéristiques de la MAF dans des modèles animaux (247, 276, 277). D'autres bactéries ont été testées en probiotiques dans des modèles murins pour des hépatopathies métaboliques (278, 279). Ainsi, ces résultats montrent que le traitement par des bactéries utilisé en tant que probiotiques peut être efficace. Notre découverte de l'impact protecteur des *Bacteroides* dans la MAF montre qu'un traitement à base de *Bacteroides* pourrait être envisagé. Cependant, nous n'avons pas à l'heure actuelle pu déterminer quelle espèce de *Bacteroides* est plus spécifiquement impliquée dans ces effets protecteurs. Nos travaux en cours et à venir se focalisent sur l'identification de ces bactéries et en particulier chez l'Homme. Notre travail se fera en collaboration avec une équipe de microbiologiste équipée et compétente pour réaliser la culture de bactéries anaérobies.

L'identification des mécanismes par lesquels les bactéries du MI exercent leurs effets est également primordiale. En effet, comprendre pourquoi et comment les populations bactériennes agissent et engendrent soit une protection soit une aggravation des lésions du foie est une étape clé. Nous nous intéressons donc non seulement aux bactéries ayant un effet bénéfique mais également aux bactéries spécifiquement associées à la sensibilité à l'alcool. Dans notre étude sur le rôle causal du MI dans la maladie alcoolique du foie (Annexe 1, (273)), nous avons mis en évidence la présence spécifique de certains *Clostridium* associés à la toxicité de l'alcool. Par ailleurs, une étude faite dans la NAFLD a mis en évidence que les *Clostridium* sont capables de produire de l'alcool en culture *in vitro* en le métabolisant. Ce métabolisme était corrélé à une augmentation de la concentration d'alcool dans le sérum chez des personnes obèses (236). Ainsi, ces bactéries pourraient aggraver les lésions induites par l'alcool en en produisant. Bien que cet effet reste à démontrer, cela renforce l'idée qu'il est essentiel d'étudier les métabolites produits par le MI.

Récemment, les métabolites fécaux tels que certains acides biliaires ont été associés à la gravité de nombreuses pathologies, comme la NAFLD en particulier au stade de cirrhose, le diabète de type 2 ou l'athérosclérose (272). Une étude multicentrique randomisée a même été réalisée chez l'Homme afin d'évaluer le rôle d'un AB synthétique (acide obéticholique) dans la NASH (280). Cependant, le rôle des AB dans la MAF n'a pas encore été clairement évalué.

Nous analysons actuellement les profils d'acides biliaires chez les patients inclus dans notre étude et présentant des MI différents. Parallèlement, nous analysons les AB chez nos souris alcoolisées. Cette étude dans le modèle murin, permet d'accéder non seulement aux dosages d'AB plasmatiques et fécaux mais également au niveau du foie. Par ailleurs, les prélèvements tissulaires permettent d'évaluer l'expression des ARNm des différents transporteurs de ces AB au niveau intestinal et hépatique. Ces informations permettent de clarifier les étapes perturbées dans le cycle entéro-hépatique des acides biliaires. En effet, ce cycle dépend des récepteurs aux AB, FXR (pour l'anglais *Farnesoid X Receptor*) et TGR5 (récepteur des acides biliaires couplé aux protéines G 5)(271, 281, 282). Par le contrôle de ces récepteurs, la boucle du cycle entéro-hépatique des AB est régulée indirectement via un produit de l'activation du FXR, le FGF15 (FGF19 chez l'Homme).

Parallèlement à ces analyses qui permettront de déterminer l'identité des AB alliés à la protection ou la sévérité de la MAF, des études sont réalisées avec des souris déficientes pour le récepteur TGR5 (Collaboration avec T. Tordjmann). Ce récepteur aux AB est principalement présent sur les cellules immunitaires et en particulier les macrophages dont les KC. Le rôle de ce récepteur est plutôt protecteur puisque son absence entraîne une stimulation pro-inflammatoire anormale des macrophages (281). Nos données préliminaires laissent penser que les souris déficientes ne présentent pas de dommages différents des souris sauvages. Ceci laisserait penser que le rôle des AB via la KC n'est pas impliqué dans notre modèle murin d'alcoolisation. Ces résultats restent cependant à confirmer.

Nous souhaiterions également utiliser des souris déficientes pour le récepteur FXR. Par ailleurs, la déficience pour FXR chez ces souris est constitutive et peut être ciblée soit au niveau du foie soit au niveau de l'intestin. L'analyse des deux localisations indépendamment, permettra d'établir si l'atteinte du système biliaire est générale ou si elle est ciblée plutôt au niveau de l'intestin ou du foie.

L'ensemble de ces données oriente donc les recherches actuelles vers une meilleure compréhension des mécanismes qui permettent au MI de protéger ou non un individu face à la toxicité hépatique de l'alcool, mais également au cours de la NAFLD. Les effets du MI et/ou de ses métabolites sur la barrière intestinale obligent à considérer cet axe intestin/foie/MI comme un « tout » imbriqué. L'analyse des bactéries et de leurs rôles nécessitant le développement de collaborations avec des microbiologistes afin de faciliter nos capacités d'études entre l'hôte et le microbiote.

La compréhension de ces mécanismes doit pouvoir permettre de proposer un traitement prébiotique, probiotique ou symbiotique (association de pré et probiotique) palliatif aux patients en échec de sevrage alcoolique. L'étude de chaque composante du MI donne un élément de réponse sur la progression des hépatopathies. Ainsi comprendre le monde de l'infiniment petit nous permettra de mieux comprendre l'évolution de ces pathologies humaines. Cependant la recherche a encore plein de mystères et d'énigmes que le chercheur doit encore résoudre.

## **ANNEXES**



## I. Annexe 1

### Intestinal microbiota contributes to individual susceptibility to alcoholic liver disease

*M. Llopis<sup>1,2,3,4</sup>, A. M. Cassard-Doulcier<sup>1,2\*</sup>, L. Wrzosek<sup>1,2</sup>, L. Boschat<sup>3,4</sup>, A.  
Bruneau<sup>3,4</sup>, **G. Ferrere<sup>1,2</sup>**, V. Puchois<sup>1,2</sup>, J. C. Martin<sup>6,7</sup>, P. Lepage<sup>3,4</sup>, T. Le Roy<sup>3,4</sup>,  
L. Lefèvre<sup>8</sup>, B. Langelier<sup>3,4</sup>, F. Cailleux<sup>1,2</sup>, A. M. González-Castro<sup>5</sup>, S. Rabot<sup>3,4</sup>,  
F. Gaudin<sup>9</sup>, H. Agostini<sup>10</sup>, S. Prévot<sup>2,11</sup>, D. Berrebi<sup>1,12</sup>, D. Ciocan<sup>1,2,13</sup>, C. Jousse<sup>14</sup>,  
S. Naveau<sup>1,2,13</sup>, P. Gérard<sup>3,4</sup>, G. Perlemuter<sup>1,2,13\*</sup>*

*Accepted dans GUT, en novembre 2015*



Cet article est complémentaire aux résultats énoncés dans l'article vue en partie 2. L'objectif de cet article est de démontrer que, chez les patients alcooliques, une dysbiose spécifique contribue au développement de lésions hépatiques graves.

Pour cela, des souris axéniques et des souris conventionnelles ont été utilisées. Le MI humain de patients alcooliques avec hépatite alcoolique sévère (sAH) ou sans hépatite alcoolique (noAH) a été transféré chez ces souris. Les conséquences sur les souris receveuses alcoolisées ont été étudiées.

Un dysbiose spécifique a été associée à la gravité de la MAF chez les patients. Le degré de sensibilité à la MAF était transmissible des patients aux souris axéniques humanisées via le transfert de MI. Les souris hébergeant le MI du patient sAH ont développé des lésions plus importantes au niveau du foie, de l'intégrité de la muqueuse intestinale, du tissu adipeux viscéral et avaient une réponse immunitaire dans les ganglions lymphatiques mésentériques plus prononcée que les souris ayant reçu le MI du patient noAH. De plus, chez les souris conventionnelles humanisées avec le MI d'un patient sAH, un deuxième transfert ultérieur du MI d'un patient noAH a permis d'améliorer la gravité des lésions hépatiques.

Ainsi le MI est un cofacteur indéniable face à la sensibilité inter-individuelle de développer une MAF chez les patients ayant une consommation excessive d'alcool. La susceptibilité individuelle à la MAF est essentiellement tirée par le MI. Le MI associé aux phénotypes sAH et noAH pourrait être différencié en fonction des différences les plus discriminantes au niveau de la composition bactérienne, des métabolites produits dont les acides biliaires.

***Dans ce travail, j'ai participé principalement aux expérimentations demandées lors du reviewing qui voulait voir si transférer le MI de noAH aux souris humanisées sAH pouvait guérir les souris. Pour cela, j'ai participé aux gavages des animaux pendant les 29 jours d'expérimentations, j'ai aussi participé à la récupération de leurs fèces afin de permettre l'analyse de leur MI. J'ai effectué en collaborations avec mes collègues la surveillance et l'entretien quotidiens des animaux. Pour finir, j'ai participé à l'abattage des animaux en vue de récupérer les différents organes pour les analyses.***





## ORIGINAL ARTICLE

# Intestinal microbiota contributes to individual susceptibility to alcoholic liver disease

M Llopis,<sup>1,2,3,4</sup> A M Cassard,<sup>1,2\*</sup> L Wrzosek,<sup>1,2</sup> L Boschhat,<sup>3,4</sup> A Bruneau,<sup>3,4</sup> G Ferrere,<sup>1,2</sup> V Puchois,<sup>1,2</sup> J C Martin,<sup>5,6</sup> P Lepage,<sup>3,4</sup> T Le Roy,<sup>3,4</sup> L Lefèvre,<sup>7</sup> B Langelier,<sup>3,4</sup> F Cailleux,<sup>1,2</sup> A M González-Castro,<sup>8</sup> S Rabot,<sup>3,4</sup> F Gaudin,<sup>9</sup> H Agostini,<sup>10</sup> S Prévot,<sup>2,11</sup> D Berrebi,<sup>1,12</sup> D Ciocan,<sup>1,2,13</sup> C Jousse,<sup>14</sup> S Naveau,<sup>1,2,13</sup> P Gérard,<sup>3,4</sup> G Perlemuter<sup>1,2,13\*</sup>

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310585>).

For numbered affiliations see end of article.

## Correspondence to

Professor Gabriel Perlemuter  
Service d'Hépatogastroentérologie et Nutrition,  
Hôpital Antoine-Béclère, 157  
rue de la Porte de Trivaux,  
Clamart cedex F-92141,  
France;  
[gabriel.perlemuter@aphp.fr](mailto:gabriel.perlemuter@aphp.fr)

Doctor Anne-Marie Cassard  
Inserm URM996, 32 rue des  
carnets, Clamart, F-92140,  
France;  
[cassard.doucier@u-psud.fr](mailto:cassard.doucier@u-psud.fr)

\*AMC and GP are  
co-corresponding authors.

Received 19 August 2015  
Revised 29 October 2015  
Accepted 1 November 2015

## ABSTRACT

**Objective** There is substantial inter-individual diversity in the susceptibility of alcoholics to liver injury. Alterations of intestinal microbiota (IM) have been reported in alcoholic liver disease (ALD), but the extent to which they are merely a consequence or a cause is unknown. We aimed to demonstrate that a specific dysbiosis contributes to the development of alcoholic hepatitis (AH).

**Design** We humanised germ-free and conventional mice using human IM transplant from alcoholic patients with or without AH. The consequences on alcohol-fed recipient mice were studied.

**Results** A specific dysbiosis was associated with ALD severity in patients. Mice harbouring the IM from a patient with severe AH (sAH) developed more severe liver inflammation with an increased number of liver T lymphocyte subsets and Natural Killer T (NKT) lymphocytes, higher liver necrosis, greater intestinal permeability and higher translocation of bacteria than mice harbouring the IM from an alcoholic patient without AH (noAH). Similarly, CD45<sup>+</sup> lymphocyte subsets were increased in visceral adipose tissue, and CD4<sup>+</sup>T and NKT lymphocytes in mesenteric lymph nodes. The IM associated with sAH and noAH could be distinguished by differences in bacterial abundance and composition. Key deleterious species were associated with sAH while the *Faecalibacterium* genus was associated with noAH. Ursodeoxycholic acid was more abundant in faeces from noAH mice. Additionally, in conventional mice humanised with the IM from an sAH patient, a second subsequent transfer of IM from an noAH patient improved alcohol-induced liver lesions.

**Conclusions** Individual susceptibility to ALD is substantially driven by IM. It may, therefore, be possible to prevent and manage ALD by IM manipulation.

## INTRODUCTION

Alcoholic liver disease (ALD) is a major public health concern. However, factors that link ethanol to the onset and progression of liver injury are poorly understood. The susceptibility of alcoholic patients to the development of ALD is highly variable. Despite a similar alcohol intake, some patients develop severe forms of alcoholic hepatitis (AH) with high mortality rate, whereas others remain

## Significance of this study

### What is already known on this subject?

- The susceptibility of alcoholic patients to develop alcoholic liver disease (ALD) is highly variable.
- An increased intestinal permeability and a consequent high load of pro-inflammatory bacterial products in blood are common features in patients with alcoholic cirrhosis and animal models of ALD.
- Intestinal dysbiosis has been associated with alcohol dependence and alcoholic cirrhosis.
- A 'cirrhosis dysbiosis ratio' indicating an imbalance of specific bacterial families has been associated with cirrhosis progression.

### What are the new findings?

- Severe alcoholic hepatitis is associated with a specific dysbiosis in alcoholic patients.
- The degree of susceptibility to alcohol-induced liver injury is transmissible from patients to mice by faecal microbiota transplantation.
- Transplantation of gut microbiota from an alcoholic patient without alcoholic hepatitis can reverse alcohol-induced liver lesions.
- Specific gut microbes and bacterial metabolites are associated with microbiota-triggered alcohol-induced inflammation.

### How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- The susceptibility of alcoholic patients to develop ALD is highly variable. We demonstrate that the individual susceptibility to alcohol-induced liver injury is driven, at least partly, by differences in intestinal microbiota composition and metabolites. Our findings open new avenues for diagnostic procedures based on personalised medicine by the identification of patients at high risk of developing alcohol-related complications by intestinal microbiota analysis. They also open new possibilities for ALD prevention and treatment through intestinal microbiota manipulation.

**To cite:** Llopis M, Cassard AM, Wrzosek L, et al. Gut Published Online First: [please include Day Month Year] doi:10.1136/gutjnl-2015-310585

reasonably healthy.<sup>1</sup> Therefore, other factors besides direct toxicity of alcohol influence the onset and progression of ALD.

An increased intestinal permeability and a consequent high load of pro-inflammatory bacterial products in blood are common features in alcoholics, subjects with alcoholic liver cirrhosis and animal models of ALD.<sup>2,3</sup> Bacterial products reaching the liver through portal circulation are cofactors for the development of tissue injury associated with alcohol abuse.<sup>4,5</sup> Recently, the increase in gut permeability in ALD has been associated to a dysbiosis-induced intestinal inflammation,<sup>6</sup> emphasising the role of intestinal microbiota (IM) in ALD. There is evidence that alcohol intake leads to small and large intestinal bacterial overgrowth in animals and humans<sup>7,8</sup> and causes changes in the taxonomic composition of the intestinal microbiome.<sup>8</sup> Intestinal dysbiosis has been associated with alcohol-dependence severity<sup>9</sup> and cirrhosis,<sup>10</sup> and recently, the term 'cirrhosis dysbiosis ratio' indicating an imbalance of specific bacterial families has been associated to cirrhosis progression.<sup>2</sup>

Nevertheless, the role of intestinal dysbiosis in the individual susceptibility of alcoholic patients to ALD has not been elucidated. Using a strategy based on human gut microbiota transplantation to mice, we aimed to demonstrate that the presence of a specific dysbiosis in patients with alcohol abuse is not only associated with liver injury but contributes to the development of severe liver disease.

## RESULTS

### Severe AH is associated with a specific dysbiosis in humans

To investigate whether the severity of ALD was associated with intestinal dysbiosis, we prospectively studied the IM composition of 38 consecutive alcoholic patients hospitalised in our department. Patients were classified into three groups (see online supplementary table S1) according to the severity of alcohol-induced liver lesions (AH score)<sup>11</sup>: no AH (noAH, N=16); non-severe AH (nsAH, N=12); severe AH (sAH, N=10). There were striking differences in IM composition between patients with sAH and those with noAH: patients with sAH harboured a dysbiosis characterised by larger amounts of *Bifidobacteria* and *Streptococci*

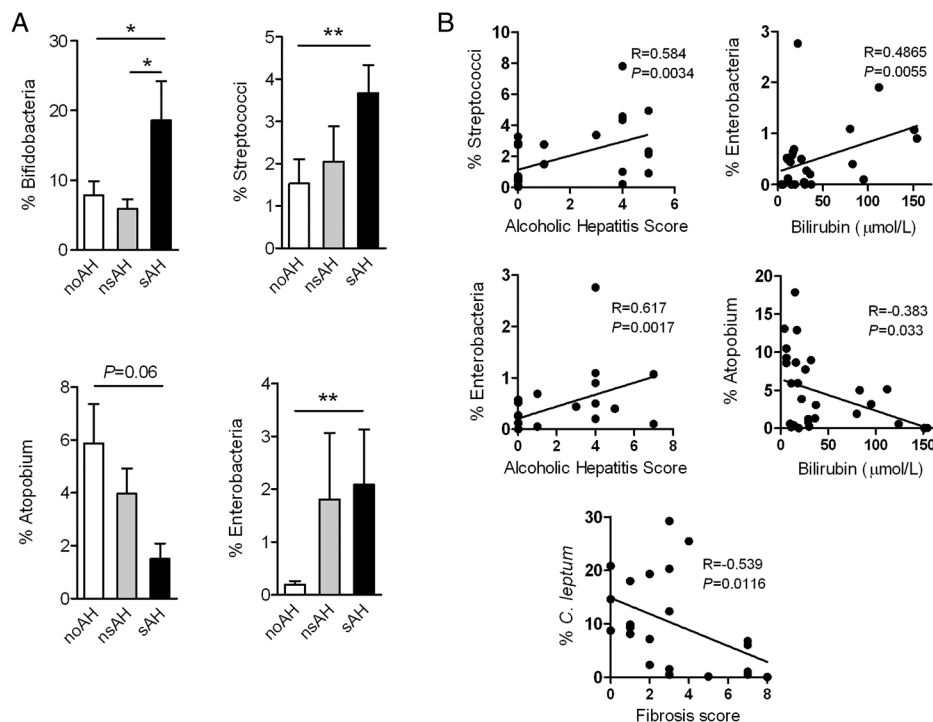
and a tendency for less *Atopobium* than patients with noAH (figure 1A). *Enterobacteria* counts were high in all patients with AH. There were no significant differences between noAH and nsAH patients for *Bifidobacteria*, *Streptococci*, *Enterobacteria* or *Atopobium*, revealing that this dysbiosis was specifically associated with sAH. *Streptococci* counts were positively correlated with the AH score (figure 1B). *Enterobacteria* counts were positively correlated with blood bilirubin levels and the AH score. Conversely, the numbers of *Atopobium* and *Clostridium leptum*, a dominant group of faecal bacteria in adult humans with demonstrated anti-inflammatory effects in the gastrointestinal tract,<sup>12</sup> were negatively correlated with blood bilirubin levels and with the fibrosis score, respectively (figure 1B). These results show that, among alcoholic patients, particular groups of gut bacteria are specifically associated with sAH.

### Transplantation of human microbiota from alcoholic patients to germ-free mice

As sAH was associated with a specific dysbiosis, we tested whether the sAH phenotype was transmissible by IM transplantation to germ-free mice. Two patients with excessive alcohol consumption, one with noAH and the other one with sAH (see online supplementary table S2: patients 1 and 3), were selected based on IM composition. We used representative patients rather than combining faeces from several patients to ensure that a balanced and stable ecosystem would be transplanted, favouring colonisation.

Two groups of 15 adult female germ-free mice were colonised by oral gavage with the IM from either the noAH patient (noAH-mice) or the IM from the sAH patient (sAH-mice) and were fed a Lieber–DeCarli diet containing 3% ethanol for 5 weeks. Bacterial composition of patients' faecal samples used for inoculation as well as faecal samples taken from recipient mice at the end of the alcohol-feeding period were deeply analysed using 454 pyrosequencing (see online supplementary materials). A total of 91 234 sequences were obtained, and after stringent trimming, 53 010 sequences (approximately 2600 sequences/sample) were further analysed and assigned to

**Figure 1** Particular communities of faecal microbiota are associated with severe forms of alcoholic hepatitis (AH) in humans. (A) Composition of the faecal microbiota of alcoholic patients with different stages of alcoholic liver disease: no alcoholic hepatitis (noAH, N=16); non-severe alcoholic hepatitis (nsAH, N=12); severe AH (sAH, N=10). (B) Correlation between alcoholic patients' faecal microbiota and the AH score, bilirubin and fibrosis score. Values are means and SEM (A), and correlations (B). Mann–Whitney test (A) and Spearman rank test (B). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .



taxonomic levels ranging from phylum to bacterial species and operational taxonomic units (OTUs). This analysis confirmed the high disparity between the microbiota compositions from the two human donors with only 30 OTUs shared by their microbiomes (see online supplementary figure S1). Also, 20 out of 29 genera (69%) were successfully transferred from the patient with sAH to sAH mice, whereas 29 genera out of 40 genera (72.5%) were successfully transferred from the patient with no AH to noAH mice (figure 2A). Distinct selective pressures within the gut habitat of each host but also differences in gut environment between humans and mice, loss of bacteria during the gavage process, as well as effect of Lieber–DeCarli diet, may explain the non-complete recovery of the human microbiota in recipient mice.

### The degree of susceptibility to alcohol-induced liver injury is transmissible from patients to mice by faecal microbiota transplant

Food intake and ethanol intake were similar for the two groups of recipient mice (figure 2B, C). After 5 weeks on the alcohol diet, noAH mice gained significantly more body weight than sAH mice (figure 2D) and sAH mice had a higher intestinal permeability than noAH mice (figure 2E).

Liver weight and the liver/body weight ratio were higher in the sAH mice group (figure 3A). There was a trend towards an increase in serum alanine aminotransferase (ALT) level in sAH mice comparison with noAH mice that did not reach statistical significance (figure 3B). As liver inflammation is usually minor in rodent models of human ALD,<sup>13</sup> we quantified intrahepatic inflammatory cells by precise lymphocyte quantification using flow cytometry.<sup>14</sup> Liver inflammation was more severe in sAH mice than in noAH mice with more infiltrating CD45<sup>+</sup> lymphocytes associated with a higher percentage of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and NKT cells (figure 3C). We also semi-quantified by

immunohistochemistry, by using a GR1 marker, polymorphonuclear neutrophil infiltration, which is characteristic of human ALD but rarely found in rodent models of ALD.<sup>13</sup> We did not find a sufficient number of cells to assess any difference between sAH mice and noAH mice (data not shown). Liver necrosis was severe in sAH mice but not in noAH mice (figure 3D, E). We analysed the expression of 120 genes in the liver of recipient mice. Principal component analysis (PCA) ordination plots of gene expression data show that the two groups clearly separated into two clusters (figure 3F). The largest differences were found in genes related to ethanol metabolism and lipogenesis with decreased expressions in sAH mice (see online supplementary table S3).

### As observed in patients, alcohol-induced liver inflammation in sAH mice is associated with a generalised inflammatory process

Consistent with the increased intestinal permeability in sAH mice (figure 2E), we found that more bacteria translocated through the intestinal epithelium in sAH than noAH mice as measured by fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelling and counting (figure 4A). The disruption of the intestinal integrity may have been due to the lower production of mucin2 (Muc2) (figure 4B) and was also associated with inflammation of the intestinal mucosa of sAH mice only (figure 4C).

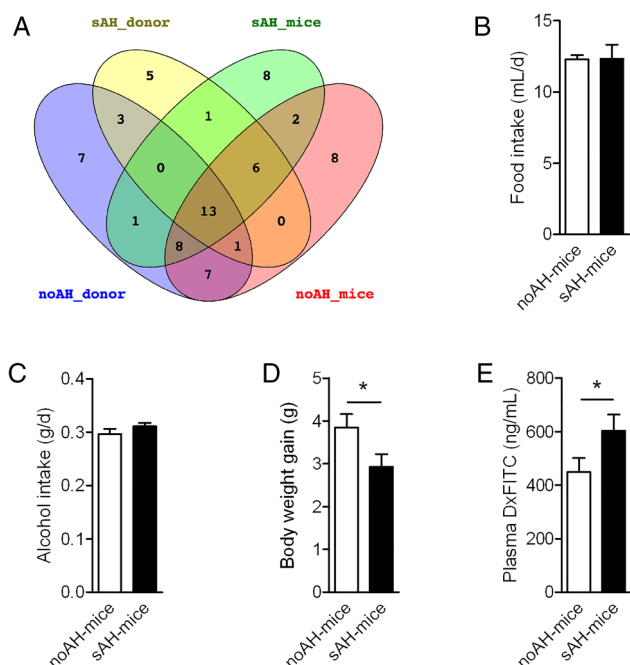
The increased intestinal permeability also led to bacterial translocation to mesenteric lymph nodes (MLNs): the number of viable translocating bacteria showed a tendency to be higher in MLN from sAH mice than from noAH mice (figure 4D). Moreover, sAH mice had higher proportions of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and NKT cells in MLN than noAH mice (figure 4E).

In patients with ALD, inflammation occurs not only in the liver but also in adipose tissue,<sup>15</sup> and visceral adipose tissue (VAT), which may affect individual susceptibility to ALD. Accordingly, we found a lymphocyte infiltrate as shown by the CD45<sup>+</sup> count with higher proportions of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and NKT in VAT from sAH mice than in VAT from noAH mice (figure 4F). This indicates that extension of inflammation to sites distal from the initial site of colonisation is more pronounced in sAH mice than in noAH mice.

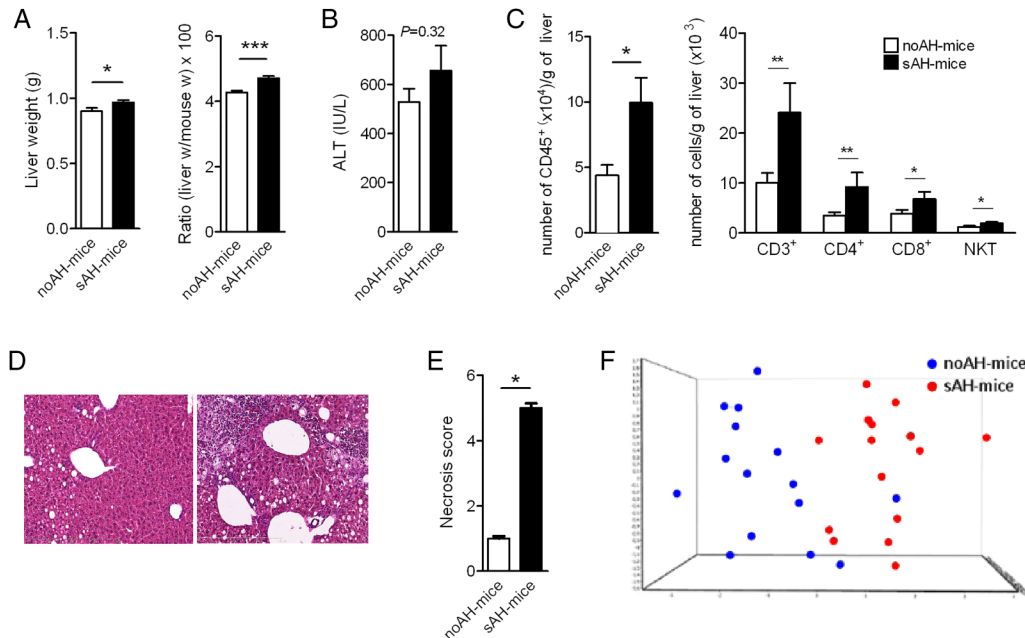
Consistent with liver gene expression findings, PCA ordination plots of ileal gene expression data show a marked discrimination between the two groups of recipient mice, indicating great differences between the two groups of mice (figure 4G). Online supplementary table S6 shows specific overexpressed genes in sAH mice with respect to noAH mice. Some genes involved in microbial protection such as IDO1 and Reg3 $\gamma$  were overexpressed in sAH mice with respect to noAH mice, whereas CPT1 and MGAT2, involved in lipid metabolism, were more strongly expressed in noAH mice than sAH mice. As in liver samples, ileal expression of alcohol dehydrogenase was weak for the sAH mice group (see online supplementary table S6). Altogether, these results demonstrate that alcohol-induced liver inflammation triggered by IM in sAH mice is a generalised process, as observed in patients.

### Gut microbiota in sAH mice differs from that in noAH mice

Gut microbiota composition was compared between sAH mice and noAH mice after 5 weeks of alcohol feeding. PCA based on bacterial genera composition showed that the microbiota from sAH mice and noAH mice differed significantly (Monte Carlo test;  $p=0.00099$ ) (figure 5A). There was no difference in diversity as indicated by Shannon (figure 5B) or Simpson (see online supplementary figure S1) indices.



**Figure 2** Phenotype of germ-free recipient mice after intestinal microbiota transplant. (A) Venn diagram based on genera distribution between human donors and recipient mice, (B) food intake, (C) alcohol intake, (D) body weight gain before euthanasia and (E) intestinal permeability. Values are means and SEM. Unpaired t test.  $N=15/\text{group}$ . \* $p<0.05$ . noAH, no alcoholic hepatitis; sAH, severe alcoholic hepatitis.



**Figure 3** Analysis of the liver of no alcoholic hepatitis (noAH) and severe alcoholic hepatitis (sAH) recipient mice. (A) Liver weight (left panel), liver weight/body weight ratio (right panel). (B) Serum alanine aminotransferase (ALT) at euthanasia. (C) Liver CD45<sup>+</sup> lymphocytes (left panel) and immunocompetent cells (right panel). (D) Representative H&E-stained sections of liver from noAH mice (left) and sAH mice (right) (x250). (E) Necrosis score. (F) Principal component analysis ordination plot of gene expression profiles in the liver of recipient mice: noAH mice (blue spots); sAH mice (red spots). Mean and SEM, unpaired t test (A–C) and Mann–Whitney test (E and F). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . N=15/group.

At the genus level, 23 genera differed significantly between sAH mice and noAH mice. *Bacteroides* was the most abundant genus in both noAH mice and sAH mice but was significantly more represented in sAH mice. Among dominant genera, *Bilophila*, *Alistipes*, *Butyrivibrio* and *Clostridium* cluster XIVa were also significantly more abundant in sAH mice than in noAH mice (figure 5C). Several subdominant genera were more represented in sAH mice too (figure 5C), and *Proteus* was solely present in sAH mice. Conversely, three dominant genera (*Barnesiella*, *Parasutterella* and an unclassified *Alphaproteobacteria* genus) were more abundant in noAH mice, the latter two being present in noAH mice only (figure 5C). Besides, several subdominant genera including *Akkermansia*, *Howardella*, *Phascolarctobacterium*, *Turicibacter*, *Desulfovibrio* or *Gemmiger* were also specific of noAH mice microbiota.

We further identified 56 OTUs that were successfully transferred from sAH donor to sAH mice and were not found in noAH donor and recipient mice (see online supplementary figure S1 and table S4). Several OTUs correspond to bacterial species associated with inflammatory diseases or insulin resistance, including *Bilophila wadsworthia*,<sup>16</sup> *Bacteroides caccae*<sup>17</sup> or *Escherichia coli*.<sup>18</sup> Moreover, 21 belonged to the Lachnospiraceae family, which is increased in alcoholic patients with high gut permeability.<sup>9</sup> Conversely, 32 OTUs that were transferred from noAH donor to noAH mice were not found in sAH donor and recipient mice (see online supplementary figure S1 and table S5). Thirteen belonged to the Ruminococcaceae family, which is decreased in alcoholic patients with high gut permeability.<sup>9</sup> In particular, two of these OTUs were relatives of *Faecalibacterium prausnitzii*, a bacterial species known for its anti-inflammatory activities<sup>12</sup> (see online supplementary tables S4 and S5). Finally, 62 specific bacterial species were differentially represented ( $p < 0.05$ ) between sAH mice and noAH mice (see online supplementary figure S2). The main bacterial species over-represented in sAH mice were *B. caccae*, *Bacteroides*

*vulgatus*, *E. coli* and *B. wadsworthia*. Conversely, *Parasutterella excrementihominis* represented 8.56% and 5.76% of total sequences in noAH mice and noAH donor, respectively, while it represented only 0.001% in sAH donor and was not detected in sAH mice, suggesting that this bacterial species may exert protective effects.

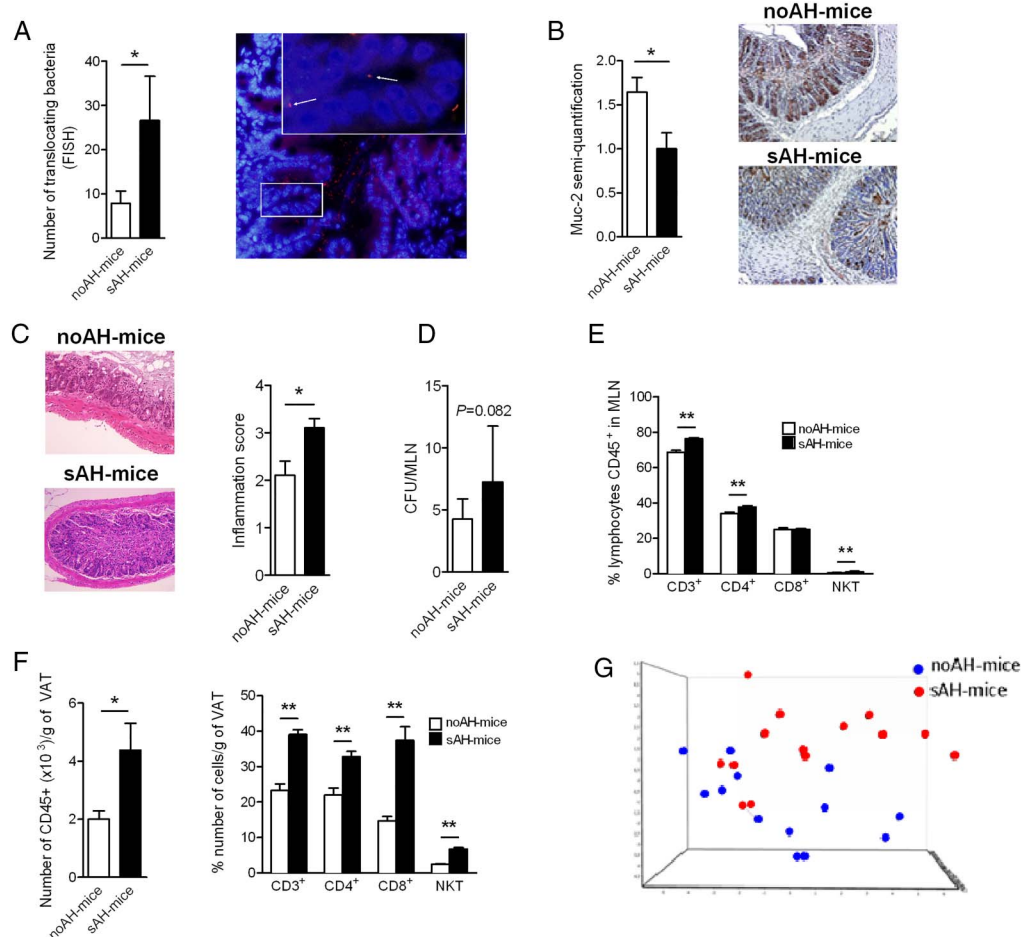
### The phenotypes of noAH mice and sAH mice are associated with different metabolites

Using an untargeted metabolomic approach based on liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry, we analysed caecal content of the recipient mice and the faeces from their respective human donors. After data extraction from all spectra and quality verifications, we selected mouse samples for multivariate analyses (see online supplementary figure S3). Non-discriminant parameters (ions) were then removed from the statistical model. We built a new model based on the 22 remaining signals (VIPs), which discriminated noAH mice from sAH mice (figure 5D–F). Thirteen biomarkers were identified from exact mass measurement and comparison with web sources (Metlin, MZedDB). The most discriminating molecules were bile acid derivatives and hydroxylated/oxygenated fatty acids. Higher amounts of the primary bile acid chenodeoxycholic acid (CDCA) were found in faecal samples of noAH mice compared with sAH mice. Notably, the secondary bile acid ursodeoxycholic acid (UDCA) was more abundant in the faecal metabolome of noAH mice than of sAH mice. This hydrophilic bile acid is produced by bacteria from CDCA<sup>19</sup> and display hepatoprotective properties.<sup>20</sup>

### Transmission of the susceptibility to alcohol-induced liver injury by faecal transplant is reproducible in conventional mice

To confirm our findings and better mimic clinical conditions, we generated a model based on faecal transplant into conventional





**Figure 4** Analysis of intestinal and visceral inflammation in recipient no alcoholic hepatitis (noAH) mice and severe alcoholic hepatitis (sAH) mice. (A) Quantification of bacteria translocating across the ileum and colon (N=8/group). Representative picture of translocating bacteria in colons of sAH mice (magnification×200). Bacteria are in red and nuclei in blue. Arrows indicate translocating bacteria (×600). (B) Immunohistochemical staining of Muc2 in colon sections from noAH mice and sAH mice and semi-quantification. (C) Representative H&E staining of sections of the ileum from noAH mice and sAH mice. Inflammation of lamina propria (arrows) (×250). Semi-quantification of inflammation. (D) Colony forming units (CFUs) of translocating bacteria in mesenteric lymph nodes (MLN). (E) MLN immunocompetent cells. (F) Visceral adipose tissue (VAT) CD45<sup>+</sup> lymphocytes (left panel) and immunocompetent cells (right panel). (G) Principal component analysis ordination plot of gene expression profiles in the ileum of recipient mice, noAH mice (blue spots) and sAH mice (red spots). Means and SEM, an unpaired t test (D–F) and Mann–Whitney test (A–C and G). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

mice (figure 6A). We used repetitive doses of polyethylene glycol laxative to prepare the mice intestine for the faecal transplant and actively maintained transplanted IM by repetitive transplantations. To avoid any bias, we did not use any antibiotics. The timetable of alcohol-feeding and IM transfer was selected according to the constraints of the maintenance of the transplanted IM, the short survival of alcohol-fed mice, the time required for the establishment of a new IM and the delay necessary for any improvement of liver disease symptoms to become evident. Thus, a shorter period of alcohol-feeding but a higher dose of alcohol was used in this conventional model compared with the GF humanised model.

In this new model (figure 6A), which is derived from another model of ALD,<sup>21</sup> the administration of sAH microbiota by itself, without alcohol feeding, led to a slight but significant increase in ALT (figure 6B). Moreover, alcohol alone without a deleterious IM did not lead to large increases in either ALT activity or liver triglyceride concentrations (figure 6B, C). The combination of alcohol and a deleterious microbiota led to large increases of ALT and liver triglyceride levels (figure 6B, C). Therefore, alcohol and IM appear to act synergistically to cause alcoholic

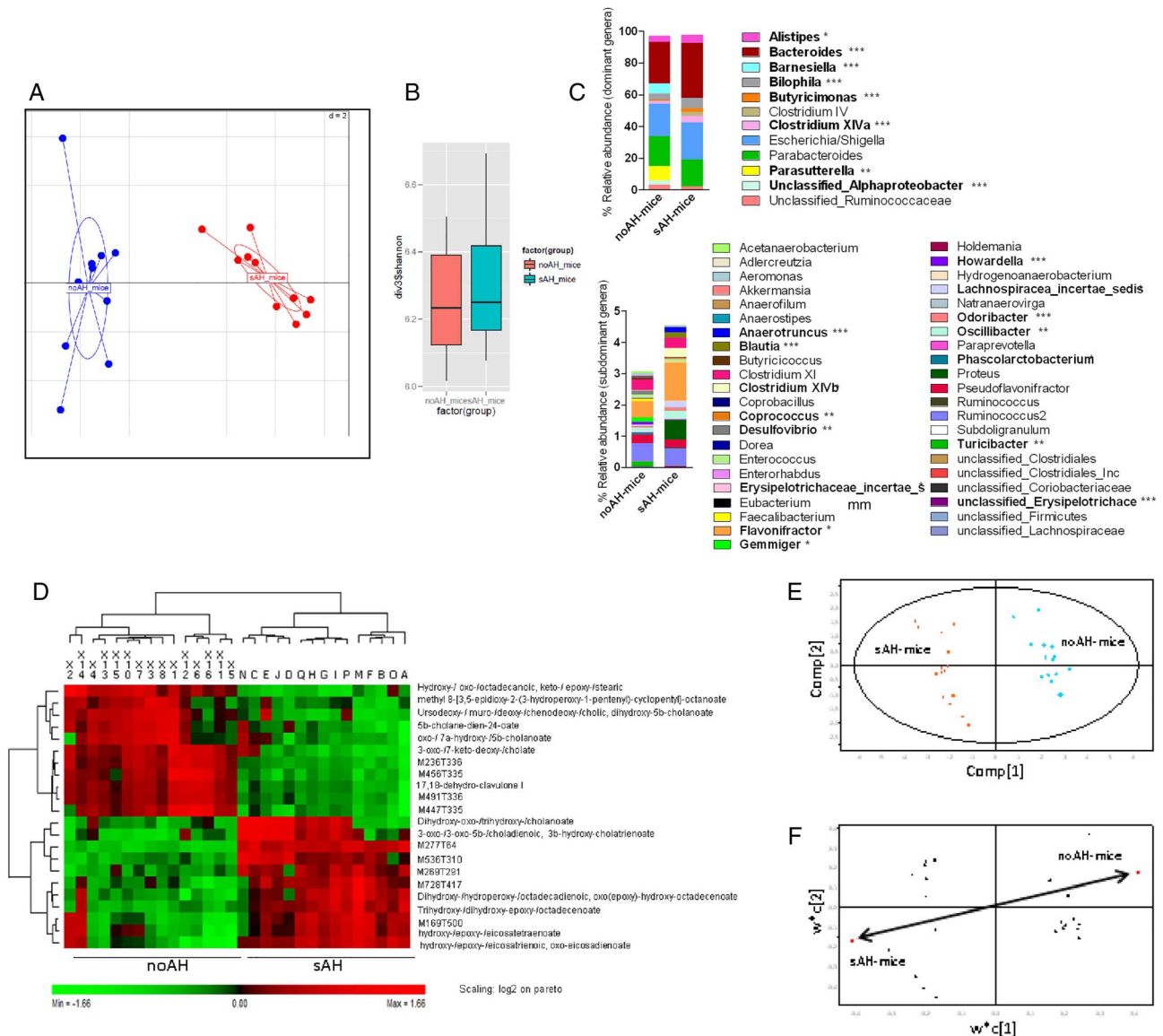
liver lesions. The reproducibility of our findings with the IM from a second patient with sAH reinforces our previous results.

### The microbiota from an alcoholic patient without alcohol hepatitis can reverse the alcohol-induced liver lesions

We then used our conventional mice model to study whether alcohol-induced liver lesions triggered by IM transplant can regress by a subsequent transplant of IM from a patient without AH.

We transferred the IM from a patient with sAH to two groups of mice and triggered liver lesions by feeding them with Lieber–DeCarli alcohol diet. One group of mice was then given the IM from an alcoholic patient with noAH (see online supplementary table S2: patient 2; figure 7A). PCA analyses confirmed that, at the end of the experiment, the IM in the two groups of recipient mice was similar to that in the corresponding donor patients (figure 7B).

Mice with the IM from the sAH patient showed an improvement of ALT levels and a decrease of liver regeneration following administration of the IM from the noAH patient: (figure 7C–E). There was also a trend for a decrease of the pathological



**Figure 5** Gut microbiota composition and metabolites produced. (A) Principal component analysis (PCA) ordination plot of faecal microbiota profiles of no alcoholic hepatitis (noAH) and severe alcoholic hepatitis (sAH) mice at the genus level. The first two components of the PCA explained 36.11% of the total variance (component 1=26.73%; component 2=9.38%) (Monte Carlo test;  $p=0.00099$ ). (B) Bacterial diversity as assessed by the Shannon index. (C) Comparison of the intestinal microbiota composition at the genera level between noAH mice and sAH mice. Dominant and subdominant genera correspond to genera representing more and less than 1% of the sequences, respectively. (D) Hierarchical clustering analysis (HCA) of the faecal metabolites. The relative amounts of metabolites in the faeces are displayed as a heatmap (values are pareto and log2 scaled).  $p$  Values analysed by partial least square discriminant analysis (PLS-DA) after cross-validation analysis of variance:  $1.3 \times 10^{-15}$ . Percentage of groups assigned according to metabolite distributions: 100% with Fisher's probability at  $6.4 \times 10^{-9}$ . Putative identification of each metabolite is based on exact mass measurement and comparison with databases. (E) PLS-DA score plot on mouse samples, after first variable selection (first PCA). Red dots, sAH mice; blue dots, noAH mice. (F) PLS-DA loading plot of mice samples, after first variable selection (first PCA). Each black triangle is a discriminant parameter involved in group differentiation and corresponds to one row in HCA.

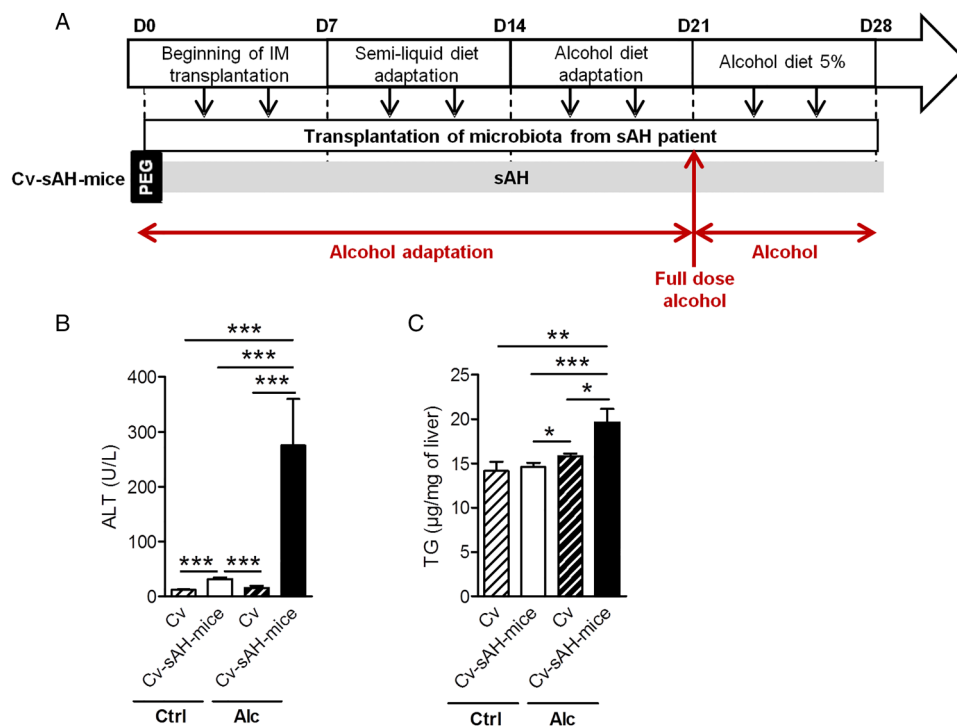
steatosis and inflammation scores (figure 7F, G). These results indicate that IM normalisation, without modifying the alcohol intake, may counteract alcohol-induced liver lesions.

## DISCUSSION

The role of the gut microbiota in ALD has recently received increasing attention and dysbiosis has been associated with alcohol consumption<sup>22</sup> and with increasing numbers of diseases. However, association studies cannot determine whether alterations of IM are a cause or a consequence of the disease. By faecal transplant experiments, we showed that a dysbiotic IM contributes to the individual susceptibility to alcohol-induced

liver lesions. Patients with sAH displayed a specific deleterious dysbiosis that was not due to alcohol by itself as all our patients had a similar history of alcohol abuse. This is in agreement with a recent report showing that not all alcohol-dependent subjects had altered composition and activity of the gut microbiota.<sup>9</sup>

We and others have already used this microbiota transplant strategy to demonstrate the causative role of intestinal bacteria in disease development including non-alcoholic fatty liver disease<sup>23</sup> or obesity.<sup>24</sup> Here, we evidence the causative role of the gut microbiota in ALD development. We further identified bacterial genera and species that were significantly and specifically associated with the noAH or sAH phenotypes.



**Figure 6** Alcohol and intestinal microbiota act synergistically to induce alcoholic liver disease. (A) Schematic representation of alcohol feeding and microbiota transplantation procedures. Mice were subjected to an intestinal purge with polyethylene glycol (PEG), gavaged 1 h after the purge with the human microbiota and then twice a week during all the experiment (black arrows). (B) Serum alanine aminotransferase (ALT). (C) Liver triglyceride (TG). Means and SEM. Mann–Whitney test. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; ns, not significant. Cv, conventional mice (control mice N=12; alcoholised mice N=9); Cv-sAH-mice, conventional mice transplanted with microbiota from a severe alcoholic hepatitis (sAH) patient (control mice N=14; alcoholised mice N=9); LDC, Lieber–DeCarli diet.

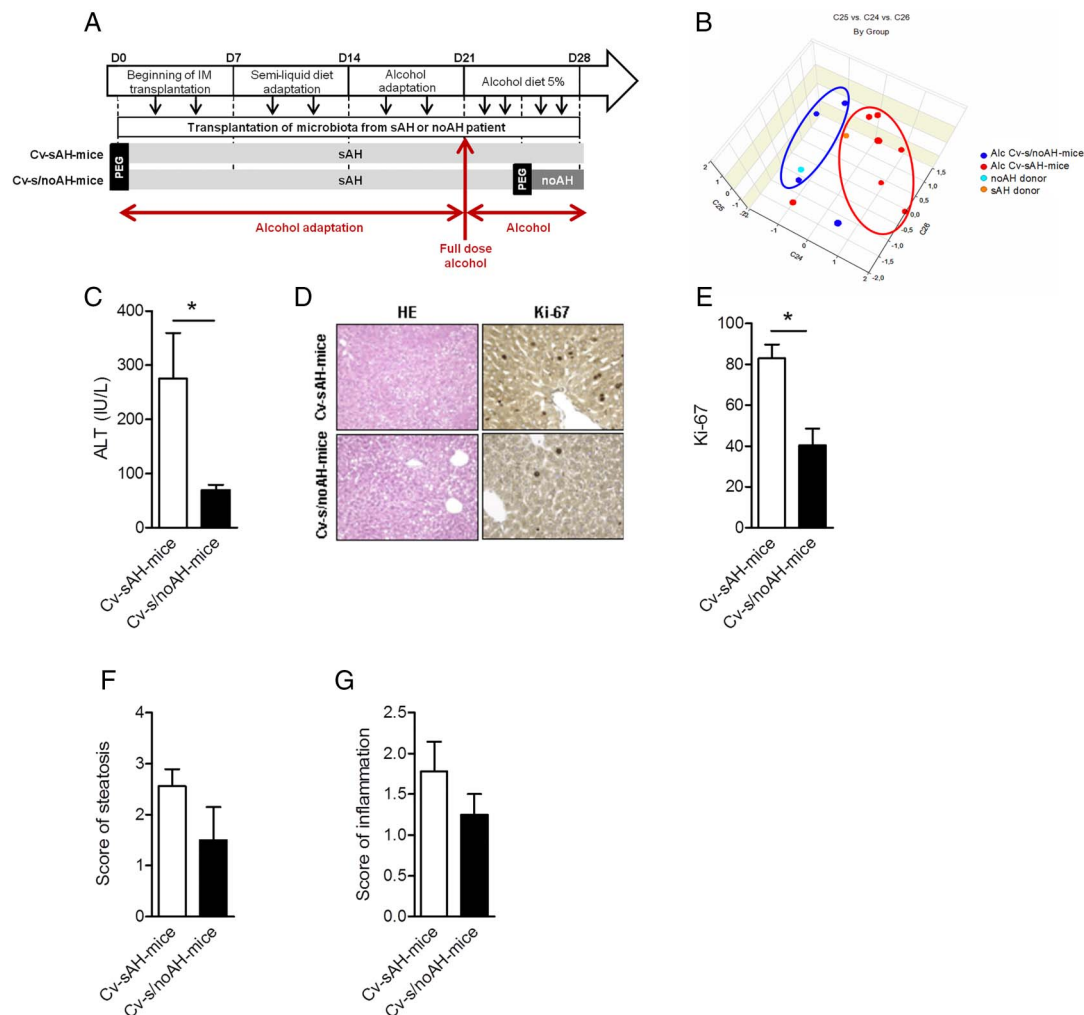
Interestingly, several bacterial groups or species over-represented in sAH mice were already associated with health disorders. This includes *Bilophila wadsworthia*, which may be able to trigger colitis in genetically prone subjects.<sup>16</sup> Similarly, bacterial species belonging to the Clostridium cluster XIVa were found to induce proinflammatory cytokine responses by human mononuclear cells.<sup>25</sup> Conversely, known ‘beneficial’ bacteria such as *Akkermansia muciniphila* that resides in mucus layer, and improves intestinal barrier and metabolic functions,<sup>26</sup> and *Faecalibacterium prausnitzii*, which exerts anti-inflammatory activities and is decreased in patients with IBD,<sup>12</sup> were more abundant in noAH mice.

An intestinal dysbiosis has been associated with increased gut permeability<sup>9</sup> that facilitates the translocation of IM components contributing to the liver injury, in a fraction of alcoholic patients only.<sup>9</sup> Consistently, despite similar alcohol intake, sAH mice had higher intestinal permeability and greater translocation of bacteria to MLN than noAH mice. The intestinal mucus layer, composed of mucins, predominantly Muc2, acts as a physical, chemical and immunological barrier<sup>27</sup> and protects the intestinal epithelium against exogenous agents. In our model, the presence of the sAH microbiota was associated with a marked reduction of Muc2 expression and an enhanced expression of the antimicrobial peptide Reg3γ. Reg3γ displays an antimicrobial activity against Gram-positive bacteria. The decreased Muc2 production, together with the enhanced antimicrobial Reg3γ activity, could be important contributors of the dysbiosis associated with the sAH phenotype.

The cause of the differences observed in IM between heavy drinkers with different susceptibility to alcohol is not clear. We hypothesise that initial differences in IM may be present before

alcohol intake and that alcoholism provokes shifts in IM composition that can condition the host susceptibility to alcohol. Only a longitudinal prospective study analysing the effects of chronic alcohol consumption on IM and the consequences of alcohol-induced dysbiosis on ALD susceptibility could validate our hypothesis. The functionality of a given ecosystem depends on metabolites produced,<sup>28</sup> and recent reports have evidenced the great impact of chronic alcohol intake on luminal metabolites.<sup>29</sup> We found striking differences in faecal metabolome between the two groups of alcoholised recipient mice. Interestingly, the most discriminant metabolites corresponded to bile acids. This is of special interest as bile acids metabolism is highly influenced by the gut microbiota and may influence glucose homeostasis, lipid metabolism, intestinal motility, bacterial overgrowth, inflammation and cancer.<sup>30</sup> We found higher amounts of the primary bile acid CDCA in faecal samples of noAH mice, which has been shown to increase the expression and production of class I alcohol dehydrogenase (ADH1) in vitro.<sup>31</sup> Accordingly, we found higher expression of ADH1 in the intestine and liver of noAH mice than in sAH mice. Hence, the IM composition in patients and mice with sAH affects bile acid derivatives, which in turn could affect the efficiency of alcohol metabolism. Similarly, UDCA was more abundant in noAH mice. Ursodeoxycholic acid (UDCA) has antioxidant properties and plays an important role in the prevention of hepatocyte death. Moreover, it is used to improve the prognosis of patients with primary biliary cirrhosis<sup>20</sup> or intrahepatic cholestasis of pregnancy.<sup>32</sup> This suggests that the IM may confer protective effects by modulating bile acid metabolism<sup>2 33</sup> and by producing protective metabolites, such as UDCA, which might contribute to the differences in the susceptibility to ALD.





**Figure 7** Reversibility of alcohol-induced liver lesions in severe alcoholic hepatitis (sAH) mice by intestinal microbiota (IM) normalisation. Conventional sAH (Cv-sAH) mice (N=9) were transplanted with IM from an sAH patient twice a week for 4 weeks and Cv-s/noAH mice (N=4) were transplanted with microbiota from an sAH patient for 24 days and then with IM from a noAH patient for 4 days. (A) Schematic representation of alcohol feeding and IM transplantation procedures. Mice were subjected to an intestinal purge with polyethylene glycol (PEG). One hour after the purge mice were gavaged with the human microbiota from an sAH patient and gavaged again twice a week (black arrows) during 21 days. Then, when the full dose of ethanol was reached, mice were gavaged four times during 1 week with the human microbiota of an sAH patient (Cv-sAH-mice) or twice with the IM of an sAH patient and, after an intestinal purge with PEG, twice with the IM of a noAH patient (Cv-s/noAH-mice) (black arrows). (B) Principal component analysis ordination plots of faecal microbiota from the two donor patients (sAH and noAH) and from the two groups of recipient mice (Cv-sAH-mice and Cv-s/noAH-mice) at the end of the experiment (D28). (C) Serum alanine aminotransferase (ALT). (D) Representative pictures of liver sections (×250) and immunostaining with Ki-67 (×400). (E) Ki-67 quantification. (F) Steatosis score. (G) Inflammation score. Means and SEM. Mann–Whitney test. \* $p < 0.05$ . LDC, Lieber–DeCarli diet.

Our general findings were thus reproduced with two different pairs of patients in two different mice models of ALD, demonstrating their robustness. Moreover, we show for the first time that the susceptibility to alcohol is reversible, at least partly, with normalisation of the IM. The transmissible factor that drives the susceptibility to alcohol might be within the unbalanced IM ecosystem, the specific transferred bacteria associated with the sAH phenotype, the metabolites produced or most probably, a conjunction of all of them. Further studies investigating the functionality of IM among alcoholic patients with similar alcohol intake and differential ALD phenotype should find the driver of the sAH phenotype.

This study, showing the feasibility of transferring a host metabolic phenotype via gut microbiota transplant, highlights the power of the humanised models to investigate the involvement of the gut microbiota in health and disease. Our work opens

new avenues for a personalised medicine based on IM monitoring to identify patients at high risk of developing alcohol-related complications. Moreover, our findings open new possibilities for the prevention or treatment of ALD through IM manipulation by the use of prebiotics, probiotics or antibiotics or by faecal transplant.

## MATERIALS AND METHODS

### Faeces collection

Each patient collected faeces during their first bowel movement following hospitalisation. An anaerobiosis generator (Anaerocult, Merck, Darmstadt, Germany) was added to samples to favour the preservation of anaerobic bacteria. The samples were processed within 24 h and fixed for fluorescence in situ hybridisation, or frozen for bacterial preservation or DNA extraction as described below.

## Animal experimentation

### Transfer of IM

Five-week-old female germ-free C57BL/6J mice were used for the IM transplant experiment. These mice were born and raised at ANAXEM, the germ-free facilities of the Micalis Institute (INRA, Jouy-en-Josas, France). The mice were maintained in sterile isolators and kept separate from germ-free breeding pairs.

The procedure for IM transplant into germ-free and conventional mice is described in the online supplementary section.

### In vivo intestinal permeability

Four hours after the gavage of mice with 4-kDa fluorescent-dextran-FITC (Dx-FITC, Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA), 100  $\mu$ L of blood was collected from the sub-mandibular vein. Intestinal permeability was determined by measuring the amount of Dx-FITC in the blood as described previously.<sup>34</sup>

### Microbiota composition and diversity

Microbiota composition was deeply analysed using 454 pyrosequencing targeting the 16S rRNA gene V3-V4 region (V3fwd: 5'TACGGRAGGCAGCAG3', V4rev: 5'GGACTACCAGGGTATCTAAT3'). The procedure details are described in the online supplementary section.

### Statistics

Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism V5 (GraphPad, San Diego, California, USA). Values are expressed as means and SEM unless indicated otherwise. For comparison of groups, normality tests were used to determine if data followed a normal distribution. Students' *t* test was used for data following a normal distribution and the Mann-Whitney test for data that were not normally distributed. Spearman's rank test was used for correlations. For all comparisons, two-sided testing was used unless indicated. A Wilcoxon signed rank test was used to compare the characteristics of the three groups of patients. Values of 5% (\**p*<0.05), 1% (\*\**p*<0.01) or 0.1% (\*\**p*<0.001) were considered to be statistically significant. For the metabolome assay, *p* values were analysed by partial least square discriminant analysis after a cross-validation analysis of variance:  $1.3 \times 10^{-15}$ . Percentage of groups assigned according to metabolite distributions: 100% with Fisher's probability at  $6.4 \times 10^{-9}$ . The NCSS9 program was used for PCA.

### Author affiliations

<sup>1</sup>INSERM UMR996—Inflammation, Chemokines and Immunopathology, Clamart, France

<sup>2</sup>Univ Paris-Sud, Univ Paris-Saclay, DHU Hepatovir, Labex LERMIT, CHU Bicêtre, Kremlin-Bicêtre, France

<sup>3</sup>INRA, UMR1319 Micalis, Jouy-en-Josas, France

<sup>4</sup>AgroParisTech, UMR Micalis, Jouy-en-Josas, France

<sup>5</sup>Faculté de Médecine, Aix-Marseille University, Marseille, France

<sup>6</sup>INSERM, UMR1062 NORT, Marseille, France

<sup>7</sup>INRA, UMR 1313, GABI-LGS Plateforme ICE, Jouy-en-Josas, France

<sup>8</sup>Department of Gastroenterology, Digestive System Research Unit, Hospital University Vall d'Hebron and VHIR, UAB, Spain

<sup>9</sup>IPSI, IFR141, Faculté de Pharmacie, Univ Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France

<sup>10</sup>AP-HP, Hôpital Bicêtre, Unité de recherche clinique Paris-Sud, Kremlin-Bicêtre, France

<sup>11</sup>AP-HP, Anatomie-pathologique, Hôpital Antoine-Béclère, Clamart, France

<sup>12</sup>AP-HP, Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Hôpital Robert Debré, Paris, France

<sup>13</sup>AP-HP, Hepatogastroenterology and Nutrition, Hôpital Antoine-Béclère, Clamart, France

<sup>14</sup>INRA, UMR1019 Nutrition Humaine, Université Clermont 1, Saint Genès Champanelle, France

**Acknowledgements** The authors thank Martine Bensaada, Benoit Lignon-Couffon, Alain Joffre, Catherine Philippe, Chantal Bridonneau and Jean-Pierre Furet for their collaboration.

**Contributors** ML designed and performed the experiments in animals, analysed data and wrote the manuscript. A-MC-D designed, performed and supervised experiments and wrote the manuscript. LW designed and performed experiments and wrote the manuscript. GF, VP, AB and LB performed animal experiments. J-CM and CJ performed the metabolomic analysis. BL and LL conducted gene expression analysis. FC, A-MG-C and TL-R conducted sample analysis. PL analysed MI sequencing data and statistics. SR advised in animal experiments. FG, DB and SP performed histological analysis. HA and DC conducted the statistical analysis. SN designed the project. PG designed the project, supervised experiments and wrote the paper. GP designed the project, included patients, supervised experiments and wrote the paper. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

**Funding** This work was supported by the FRM (Foundation for Medical Research), INSERM, Univ Paris-Sud, ERAB (European Research Advisory Board), SNFGE (French National Society of Gastroenterology), AFEF (French Association for the Study of Liver), IREB (Institut de Recherches sur les Boissons), IRIS (Institut de Recherches Internationales Servier).

**Competing interests** ML was supported by EASL (European Association for the Study of Liver) and INRA, and FC by the French Ministry of Research and ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer). GP has received travel funds from Janssen, Abbvie and Gilead, consulting fees from Bayer, Biocodex, Roche, Gilead and Servier, and royalties from Elsevier-Masson and John Libbey Eurotext.

**Patient consent** Obtained.

**Ethics approval** This study was approved by the local ethics committee (CPP). The animal experimentation had authorisation 78-60 from French Veterinary Services.

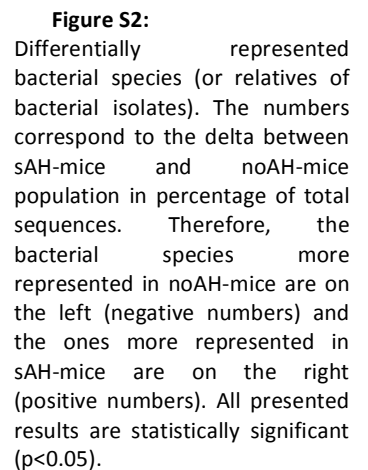
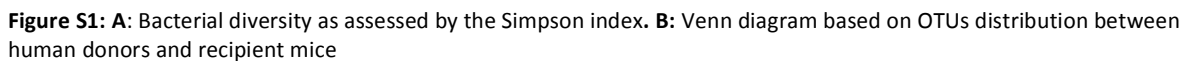
**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

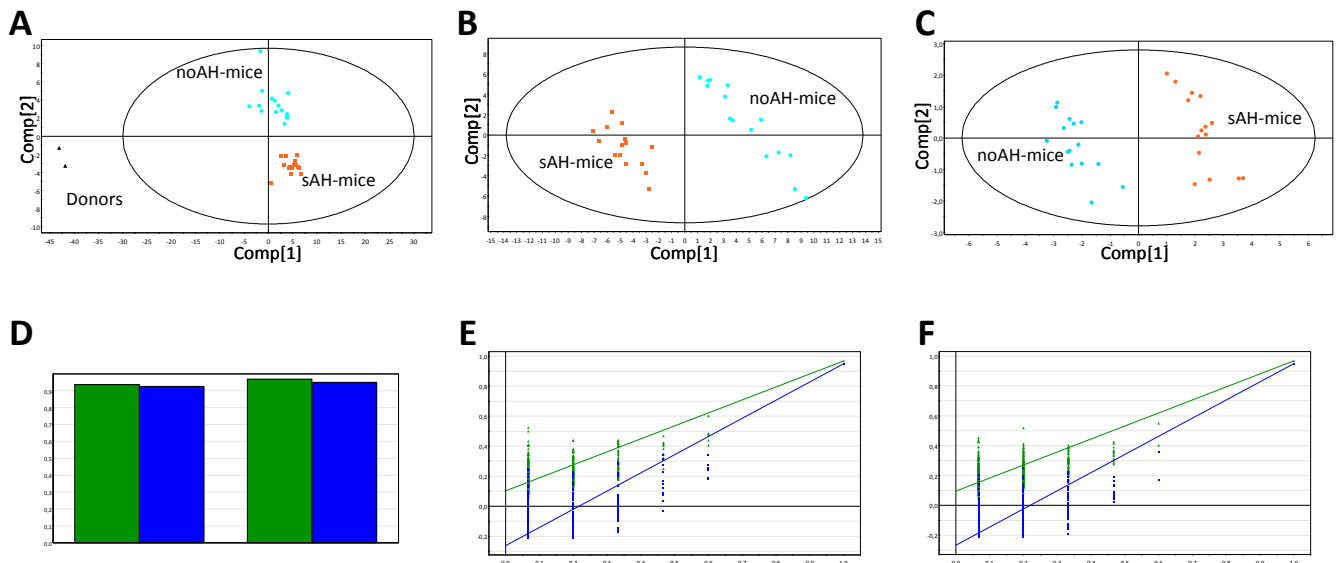
**Data sharing statement** All the data of the present study will be published in the present manuscript.

## REFERENCES

- 1 Teli MR, Day CP, James O.F.W, Burt AD, *et al.* Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver. *Lancet* 1995;346:987–90.
- 2 Bajaj JS, Heuman DM, Hylemon PB, *et al.* Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. *J Hepatol* 2014;60:940–7.
- 3 Parlesak A, Schäfer C, Schütz T, *et al.* Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol* 2000;32:742–7.
- 4 Ferrier L, Bérard F, Debrauwer L, *et al.* Impairment of the intestinal barrier by ethanol involves enteric microflora and mast cell activation in rodents. *Am J Pathol* 2006;168:1148–54.
- 5 Szabo G, Bala S, Petrasek J, *et al.* Gut-liver axis and sensing microbes. *Dig Dis* 2010;28:737–44.
- 6 Chen P, Torralba M, Tan J, *et al.* Supplementation of saturated long-chain fatty acids maintains intestinal eubiosis and reduces ethanol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology* 2015;148:203–14.e16.
- 7 Bode JC, Bode C, Heidelbach R, *et al.* Jejunal microflora in patients with chronic alcohol abuse. *Hepatogastroenterology* 1984;31:30–4.
- 8 Yan AW, Fouts DE, Brandl J, *et al.* Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology* 2011;53:96–105.
- 9 Leclercq S, Matamoros S, Cani PD, *et al.* Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:E4485–93.
- 10 Qin N, Yang F, Li A, *et al.* Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature* 2014;513:59–64.
- 11 International Group. Alcoholic liver disease: morphological manifestations. Review by an international group. *Lancet* 1981;1:707–11.
- 12 Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, *et al.* Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:16731–6.
- 13 Brandon-Warner E, Schrum LW, Schmidt CM, *et al.* Rodent models of alcoholic liver disease: of mice and men. *Alcohol* 2012;46:715–25.
- 14 Bigorgne AE, Bouchet-Delbos L, Naveau S, *et al.* Obesity-induced lymphocyte hyperresponsiveness to chemokines: a new mechanism of Fatty liver inflammation in obese mice. *Gastroenterology* 2008;134:1459–69.
- 15 Naveau S, Cassard-Doulcier AM, Nijké-Nakseu M, *et al.* Harmful effect of adipose tissue on liver lesions in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2010;52:895–902.
- 16 Devkota S, Wang Y, Musch MW, *et al.* Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in IL10<sup>-/-</sup> mice. *Nature* 2012;487:104–8.

- 17 Wei B, Dalwadi H, Gordon LK, *et al.* Molecular cloning of a *Bacteroides caccae* TonB-linked outer membrane protein identified by an inflammatory bowel disease marker antibody. *Infect Immun* 2001;69:6044–54.
- 18 Carvalho FA, Koren O, Goodrich JK, *et al.* Transient inability to manage proteobacteria promotes chronic gut inflammation in TLR5-deficient mice. *Cell Host Microbe* 2012;12:139–52.
- 19 Gérard P. Metabolism of cholesterol and bile acids by the gut microbiota. *Pathogens* 2014;3:14–24.
- 20 Poupon RE, Poupon R, Balkau B. Ursodiol for the long-term treatment of primary biliary cirrhosis. The UDCA-PBC Study Group. *N Engl J Med* 1994;330:1342–7.
- 21 Bertola A, Mathews S, Ki SH, *et al.* Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). *Nat Protoc* 2013;8:627–37.
- 22 Szabo G. Gut-liver axis in alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 2015;148:30–6.
- 23 Le Roy T, Llopis M, Lepage P, *et al.* Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* 2013;62:1787–94.
- 24 Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, *et al.* Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 2013;341:1241214.
- 25 Tuovinen E, Keto J, Nikkilä J, *et al.* Cytokine response of human mononuclear cells induced by intestinal *Clostridium* species. *Anaerobe* 2013;19:70–6.
- 26 Everard A, Belzer C, Geurts L, *et al.* Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:9066–71.
- 27 Shan M, Gentile M, Yeiser JR, *et al.* Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science* 2013;342:447–53.
- 28 Lozupone CA, Stombaugh JJ, Gordon JJ, *et al.* Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 2012;489:220–30.
- 29 Xie G, Zhong W, Li H, *et al.* Alteration of bile acid metabolism in the rat induced by chronic ethanol consumption. *FASEB J* 2013;27:3583–93.
- 30 Sipka S, Bruckner G. The immunomodulatory role of bile acids. *Int Arch Allergy Immunol* 2014;165:1–8.
- 31 Langhi C, Pedraz-Cuesta E, Haro D, *et al.* Regulation of human class I alcohol dehydrogenases by bile acids. *J Lipid Res* 2013;54:2475–84.
- 32 Paumgartner G, Beuers U. Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology* 2002;36:525–31.
- 33 Kakiyama G, Pandak WM, Gillevet PM, *et al.* Modulation of the fecal bile acid profile by gut microbiota in cirrhosis. *J Hepatol* 2013;58:949–55.
- 34 Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, *et al.* Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 2009;58:1091–103.



**Figure S3**

**Figure S3.** PCA and PLS on fecal metabolome data from patients (black triangles) and recipient mice (orange boxes for sAH, blue dots for noAH). (A) PCA ordination plot on all data using all mass spectrometry parameters. (B) PLS on data from mice samples using all mass spectrometry parameters and used for parameter filtration. (C) PCA ordination plot on data from mice samples using filtered mass spectrometry parameters. (D, E, F) Validations of PLS-DA performed on the data presented in figure 6. (D) Model overview plot for the two principal components. R2Y, in green, is the percentage of explained group variance. Q2Y, in blue, is the percentage of predicted group variance. (E) Permutation test (500 times randomly permuted) on the first principal component. (F) Permutation test (500 times randomly permuted) on the second principal component.

**Table S1. Characteristics of patients.**

	<i>noAH</i> <i>N=16</i>	<i>nsAH</i> <i>N=12</i>	<i>sAH</i> <i>N=10</i>	<i>P-value</i>
Age (yr)	54±3	50±3	57±9	NS
Alcohol consumption (g/d)	155±31	185±23	101±16	NS
Duration of alcohol intake (yr)	16±4	28±5	23±5	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.1±1.2	24.0±3.2	25.7±2.8	NS
AST (IU/L)	84±16	163±40	113±16	NS
Albumin (g/L)	38±2	37±2	28±3	<0.05
Blood glucose (mmol/L)	4.9±0.14	5.3±0.3	5.4±0.3	NS
Triglycerides (g/L)	1.41±0.17	1.41±0.4	0.73±0.04	NS
PT (%)	86±6	78±7	35±14	<0.05
Bilirubin (μmol/L)	16±3	30 ± 10	105±16	<0.05
Maddrey discriminant function	10.6±2.4	16.4±4.4	40.0±11.4	<0.05

BMI: body mass index; PT: prothrombin time as percentage of control; AST: aspartate aminotransferase; noAH: no alcoholic hepatitis; nsAH: non-severe alcoholic hepatitis; sAH: severe alcoholic hepatitis. NS: not significant. Data presented are mean ± s.e.m. Wilcoxon signed rank test.

**Table S2. Characteristics of donor patients.**

Donor patient	1	2	3	4
<b>Alcoholic hepatitis</b>	No	No	Severe	Severe
<b>Recipient mice</b>	Germ-free	Conventional	Germ-free	Conventional
<b>Age (yr)</b>	50	39	40	52
<b>Alcohol consumption (g/d)</b>	70	80	220	130
<b>Duration of alcohol intake (yr)</b>	35	20	10	19
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	17.1	23.1	24.5	21
<b>AST (IU/L)</b>	24	32	135	120
<b>Albumin (g/L)</b>	38.4	45.5	30.9	25
<b>Blood glucose (mmol/L)</b>	4.0	5.2	4.4	5.7
<b>Triglycerides (g/L)</b>	1.27	1.81	1.19	0.81
<b>PT (%)</b>	100	100	43	42
<b>Bilirubin (μmol/L)</b>	13	13	140	141
<b>Maddrey discriminant function</b>	NA	NA	33	37

BMI: body mass index; PT: prothrombin time as percentage of control; AST: aspartate aminotransferase. NA: not applicable. Data presented are mean ± s.e.m.

**Table S3. Relative expression of genes analyzed in liver of mice colonized with the IM from a patient with severe alcoholic hepatitis (sAH-mice) versus mice colonized with the IM from an alcoholic patient without alcoholic hepatitis (noAH-mice).**

LIPID METABOLISM		Fold change	P	
Hmgcr	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	-1.383	0.001	*
Slc27a5	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 5	-1.245	0.001	*
Fas	Fatty acid synthase	-1.353	0.009	*
Dgat2	Diacylglycerol O-acyltransferase 2	-1.132	0.018	*
Scd1	Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	-1.484	0.018	*
Ppara	Peroxisome proliferator activated receptor alpha	-1.098	0.046	*
Mttp	Microsomal triglyceride transfer protein	-1.070	0.056	°
Dgat1	Diacylglycerol O-acyltransferase 1	-1.114	0.068	°
Pparg	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	-1.114	0.114	
Fabp2	Fatty acid binding protein 2, intestinal	1.089	0.146	
Fabp4	Fatty acid binding protein 4, adipocyte	1.192	0.171	
Srebf1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1	-1.092	0.171	
Cpt1a	Carnitine palmitoyl transferase 1a	-1.034	0.561	
ALCOHOL METABOLISM				
Adh5	Alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide	-1.136	0.001	*
Aldh1a1	Aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1	-1.255	0.001	*
Aldh4a1	Aldehyde dehydrogenase 4 family, member A1	-1.220	0.001	*
Cyp2e1	Cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1	-1.343	0.001	*
Cyp4a14	Cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 14	1.316	0.001	*
Adh1	Alcohol dehydrogenase 1 (class I)	-1.123	0.006	*
Adh7	Alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide	-1.129	0.034	*
Aldh2	Aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial	-1.076	0.042	*
Aldh1a3	Aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A3	-1.211	0.047	*
Acaca	Acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha	-1.091	0.146	
Abca6	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 6	-1.070	0.184	
Acat1	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1	1.038	0.406	
Ddit3	DNA-damage inducible transcript 3	1.047	0.56	
Aldh3a1	Aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A1	1.047	0.67	
Aldh3b1	Aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1	-1.035	0.913	

<b>FIBROSIS</b>				
Card10	Caspase recruitment domain family, member 10	-1.134	0.077	°
Col18a1	Procollagen, type XVIII, alpha 1	-1.097	0.092	°
Col1a1	Procollagen, type I, alpha 1	1.657	0.183	
a-SMA	Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	1.697	0.265	
Card14	Caspase recruitment domain family, member 14	1.091	0.305	
Icam1	Intercellular adhesion molecule	-1.067	0.615	
Card11	Caspase recruitment domain family, member 11	1.060	0.878	
<b>INFLAMMATION</b>				
Cxcl12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	-1.147	0.001	*
Nkiras2	NFKB inhibitor interacting Ras-like protein 2	-1.166	0.001	*
Tlr5	Toll-like receptor 5	-1.342	0.001	*
Tgfb2	Transforming growth factor, beta receptor II	-1.119	0.002	*
Tnfsf15	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	-1.485	0.002	*
Tnfrsf1a	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	-1.195	0.003	*
Msr1	Macrophage scavenger receptor 1	-1.160	0.008	*
Traf4	Tnf receptor associated factor 4	-1.139	0.008	*
Tnfrsf11a	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a	-1.186	0.014	*
Traf5	Tnf receptor-associated factor 5	-1.146	0.015	*
Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1	-1.185	0.017	*
Hspa5	Heat shock protein 5	1.231	0.022	*
Tlr3	Toll-like receptor 3	-1.149	0.027	*
Fadd	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	-1.136	0.030	*
Ikbkg	Inhibitor of kappaB kinase gamma	-1.105	0.030	*
Il10	Interleukin 10	-1.287	0.034	*
Ptafr	Platelet-activating factor receptor	-1.149	0.038	*
Traf6	Tnf receptor-associated factor 6	-1.108	0.038	*
Irak1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1	-1.083	0.042	*
Tgfb1	Transforming growth factor, beta receptor I	-1.105	0.042	*
Ikbkb	Inhibitor of kappaB kinase beta	-1.077	0.047	*
Irak1bp1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 binding protein 1	-1.162	0.052	°
Tnf	Tumor necrosis factor	-1.234	0.052	°
Emr1	EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 1	-1.166	0.074	°
Tnfrsf10b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	1.488	0.077	°
Cd68	Cd68 molecule	-1.182	0.081	°
Nfkbib	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, beta	-1.103	0.084	°
Tlr2	Toll-like receptor 2	-1.265	0.084	°
Cd163	CD163 antigen	-1.099	0.089	°
Marco	Macrophage receptor with collagenous structure	-1.081	0.097	°
Csf1	Colony stimulating factor 1 (macrophage)	-1.124	0.121	
Il1a	Interleukin 1 alpha	-1.101	0.121	
Tgfb3	Transforming growth factor, beta receptor III	-1.094	0.121	
Il2	Interleukin 2	-1.273	0.132	
Tlr7	Toll-like receptor 7	-1.083	0.143	
Fcrls	Fc receptor-like S, scavenger receptor	1.217	0.146	
Il1b	Interleukin 1 beta	-1.144	0.156	
Cxcl1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	1.823	0.169	
Irf1	Interferon regulatory factor 1	-1.127	0.183	
Malt1	Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1	-1.092	0.183	
Nfkb1	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1, p105	-1.063	0.197	
Rbx1	Ring-box 1	-1.076	0.197	
Il12a	Interleukin 12	-1.146	0.213	

Tlr6	Toll-like receptor 6	-1.133	0.213
Cxcl16	Chemokine (C-X-C motif) ligand 16	-1.065	0.245
Nr1h3	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	-1.068	0.262
Ripk1	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	-1.032	0.265
Tlr4	Toll-like receptor 4	-1.028	0.280
Nfkbia	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	-1.090	0.284
Rel	Reticulo endotheliosis oncogene	-1.059	0.284
Rela	Reticulo endotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	-1.047	0.284
Tgfb2	Transforming growth factor, beta 2	1.000	0.305
Tlr9	Toll-like receptor 9	-1.074	0.340
Traf2	Tnf receptor-associated factor 2	-1.046	0.348
Il1r1	Interleukin 1 receptor, type I	1.084	0.370
Nos2	Nitric oxide synthase 2, inducible, macrophage	1.058	0.394
Lbp	Lipopolysaccharide binding protein	1.037	0.406
Arg1	Arginase, liver	-1.026	0.430
Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	-1.135	0.471
Traf3	Tnf receptor-associated factor 3	-1.053	0.471
Ifng	Interferon gamma	-1.110	0.480
Ccl20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	-1.146	0.498
Irak2	Interleukin-1 receptor-associated kinase 2	-1.052	0.498
Creb1	cAMP responsive element binding protein 1	-1.025	0.512
Scarb1	Scavenger receptor class B, member 1	-1.041	0.533
Nfkbie	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon	-1.033	0.555
Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	1.047	0.585
Tgfb3	Transforming growth factor, beta 3	1.185	0.585
Tnfsf11	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11	1.064	0.615
Il2ra	Interleukin 2 receptor, alpha chain	1.096	0.646
Traf1	Tnf receptor-associated factor 1	-1.107	0.646
Il12b	Interleukin 12b	-1.044	0.678
MLXipl	MLX interacting protein-like	-1.059	0.678
Nfkb2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p49/p100	1.032	0.678
Csf2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	-1.172	0.710
Cxcr4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	1.142	0.743
Ptges	Prostaglandin E synthase	1.039	0.743
Mrc1	Mannose receptor, C type 1	-1.037	0.771
Cd14	CD14 antigen	-1.064	0.835
Myd88	Myeloid differentiation primary response gene 88	-1.027	0.844
Relb	Avian reticulo endotheliosis viral (v-rel) oncogene related B	1.008	0.844
Il6	Interleukin 6	-1.017	0.878
FasL	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	-1.064	0.947
Nkiras1	NFKB inhibitor interacting Ras-like protein 1	-1.013	0.965
Tnfaip3	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	-1.014	0.982

The values shown are fold change for sAH-mice vs noAH-mice. Significance is calculated with the Mann-Whitney test \* $P < 0.05$  and ° $P < 0.1$  ( $N = 15$  mice per group).

**Table S4. sAH transferred OTUs (available online , Gut 2015 )**

**Table S5. NoAH transferred OTUs (available online, Gut 2015)**



**Table S6. Relative expression of genes in the ileum of mice colonized with the IM from a patient with severe alcoholic hepatitis (sAH-mice) versus without (noAH-mice).**

LIPID METABOLISM		Fold change	P	
CPT1	Diacylglycerol choline phosphotransferase	-1.499	0.008	*
MGAT2	Mannosyl ( $\alpha$ -1,6-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetyl glucosaminyl transferase	-1.345	0.049	*
RXR $\alpha$	Retinoid X receptor alpha	1.177	0.055	°
GPR41 (FFAR3)	Free fatty acid receptor 3	-1.631	0.085	°
DGAT1	Diacylglycerol O-acyltransferase 1	-1.161	0.126	
PPAR $\delta$	Peroxisome proliferator activator receptor delta	1.138	0.167	
GPR120 (FFAR4)	Free fatty acid receptor 4	1.197	0.198	
FABP2/L-FABP	Fatty acid binding protein 2, intestinal	1.399	0.320	
GPR43 (FFAR2)	Free fatty acid receptor 2	-1.211	0.344	
CD36/FAT	CD36 antigen	-1.269	0.452	
PPAR $\alpha$	Peroxisome proliferator activated receptor alpha	1.057	0.512	
FATP4	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 4	1.121	0.577	
GPR40 (FFAR1)	Free fatty acid receptor 1	-1.118	0.610	
PPAR $\gamma$	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	-1.086	0.610	
ACS (Acsl1)	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	-1.006	0.752	
FABP4/I-FABP	Fatty acid binding protein 4, adipocyte	1.070	0.790	
INFLAMMATION				
NOS2	Nitric oxide synthase 2, inducible (NOS2)	2.227	0.004	*
CCL11	Chemokine (C-C motif) ligand 11	-1.548	0.014	*
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	-1.245	0.069	°
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1	-1.241	0.085	°
LITAF	Lipopolysaccharide-induced TNF factor (LITAF)	1.287	0.085	°
IL11	Interleukin 11	-1.304	0.182	
CXCL5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	-1.255	0.423	
IL23A	Interleukin 23, alpha subunit p19	-1.149	0.544	
TLR5	Toll-like receptor 5	-1.166	0.544	
MIP2	Macrophage inflammatory protein 2	-1.195	0.645	
IL6	Interleukin 6	-1.297	0.680	
KC	Interleukin 8	-1.139	0.716	
IL1B	Interleukin 1, beta	-1.036	0.827	
TLR4	Toll-like receptor 4	-1.013	0.942	
TLR2	Toll-like receptor 2	1.048	0.981	
INTESTINE INTEGRITY				
OCN	Occludin	1.205	0.085	
MUC1	Mucin 1, cell surface associated	-1.098	0.344	
ZO-1	Tight junction protein 1	1.019	0.680	
CLDN1	Claudin 1	-1.151	0.752	
MICROBIAL PROTECTION				
Reg3 $\gamma$	Regenerating islet-derived 3 gamma	1.984	0.003	*
IDO1	Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1)	1.678	0.008	*
Reg3 $\beta$	Regenerating islet-derived 3 beta	1.447	0.062	°
ALCOHOL METABOLISM				
ADH1	Alcohol dehydrogenase ADH1	-1.356	0.005	*
ALDH2	Aldehyde dehydrogenase 2, tandem duplicate 2	1.109	0.104	
PNPLA3	Patatin-like phospholipase domain containing 3	1.222	0.512	

The values shown are fold change for sAH-mice vs noAH-mice. Significance is calculated with the Mann-Whitney test \* $P < 0.05$  and ° $P < 0.1$  ( $N = 10$  mice per group).

**Table S7. Nomenclature, sequences and targets of probes used for fluorescent *in situ* hybridization.**

<i>Probe name</i>	<i>Sequence (5'® 3')</i>	<i>Target</i>	<i>Fluorochrome</i>
EUB 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	domain Bacteria	5'FITC
EUB 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	domain Bacteria	5'CY5
NON EUB 338	ACATCCTACGGGAGGC	none	5'FITC
NON EUB 338	ACATCCTACGGGAGGC	none	5'CY5
Bif164	CATCCGGCATTACCACCC	<i>Bifidobacterium</i> genus	5'CY5
Bac303	CCAATGTGGGGGACCTT	<i>Bacteroides-Prevotella</i> group	5'CY5
Lab158	GGTATTAGCAYCTGTTTCCA	<i>Lactobacillus-Lactococcus-</i> <i>Enterococcus</i> group	5'CY5
	GTTTTRTCAACGGCAGTC		
	Competitor 1		
Clep 1156	GRTTTTRTCAYCGGCAGTC*	<i>Clostridium leptum</i> subgroup	5'CY5
	Competitor 2		
	GTVTTTRTCBACGGCAGTC*		
Ato 291	GGTCGGTCTCTCAACCC	<i>Atopobium</i> cluster and <i>Coriobacterium</i> group	5'CY5
Enter 1432	CTTTTGCAACCCACT	Enterobacteria	5'CY5
Erec 482	GCTTCTTAGTCAGGTACCG	<i>Clostridium coccooides</i> group	5'CY5
Strc 493	GTTAGCCGTCCCTTTCTGG	Streptococci and Lactococci	5'CY5
		<i>Clostridium difficile</i> and	
Cdif198+Cperf 191	TCCATCCTGTACTGGCTCACC	<i>Clostridium perfringens</i>	5'CY5
Muc 1437	CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT	<i>Akkermansia muciniphila</i>	5'CY5
Ecyl 387	CGCGGCATTGCTCGTTCA	Erysipelotrichi	5'CY5
MIB 661	GCATTCCGCATACTTCTC	mouse intestinal Bacteria	5'CY5

\*Y = C/T, R = G/A, K = G/T, M = C/A, W = A/T, B = C/G/T and V = G/C/A

**Table S8. Composition of the modified Lieber-DeCarli diet.**

<i>Ingredients</i>	<i>g/L</i>
Casein (100 Mesh)	41.4
L-Cysteine	0.5
DL-Methionine	0.3
Corn Oil	39.6
Maltose Dextrin	25.6
Cellulose	10.0
Salt Mix	8.75
Vitamin Mix	2.5
Choline Bitartrate	0.53
XanthanGum	3.0



## SUPPLEMENTAL MATERIALS AND METHODS

### Patients

All patients were admitted to the hepatogastroenterology department of Antoine-Béclère University Hospital, Clamart, France.

Alcoholic patients were eligible for inclusion if they had consumed at least 50 g of alcohol per day over the previous year, were negative for hepatitis B surface antigens, and seronegative for antibodies against hepatitis C virus (HCV). All patients gave their informed consent. Exclusion criteria were gastrointestinal bleeding, bacterial infection, hepatocellular carcinoma or other carcinoma, acute pancreatitis, other severe associated disease, diabetes mellitus, dyslipidemia, presence of anti-HIV antibodies, and antibiotic intake in the last 3 months. We used a standardized questionnaire, to collect information about alcohol consumption [1]. The patients' families were also interviewed, when possible. Patients were questioned about the total duration of alcoholism and their daily alcohol intake during the five years preceding their first hospitalization due to alcoholism or ALD. This restricted, five-year time period was imposed because patients may have difficulties remembering a longer history of dietary intake and alcohol consumption. Questions were asked about the duration of alcohol abuse, the daily consumption of beer, wine, before dinner drinks (aperitifs), and spirits (strong liquors), and the types of aperitifs consumed (aniseed-based spirits, whisky, or others). The daily intake of each beverage was converted to grams of pure ethanol, and the total daily consumption of ethanol was calculated by combining the amounts consumed for each type of beverage.

Alcoholic patients with abnormal liver function underwent liver biopsy. A total of 38 alcoholic patients were prospectively and consecutively included (Table S1).

### Liver biopsies

Patients underwent liver biopsy  $5.6 \pm 0.5$  days after admission. One sample was used for histological assessment. The staining procedure included hematoxylin-eosin-saffron, Masson's trichrome and picrosirius stains. All biopsy samples were evaluated independently by two pathologists who were blind to the patient's clinical and biological data and history of alcohol abuse. Internationally accepted morphological criteria [2] were used for this evaluation. Alcoholic hepatitis (AH) was defined according to the extent of damage to liver cells, which was typically manifest as ballooning degeneration with areas of necrosis and infiltration of PMNs. A scoring system was used for AH, combining an analysis of liver features particular to alcoholics: acidophilic bodies (0: none; 1:  $\leq 1$ /lobule

or nodule; 2:  $> 1$ /lobule or nodule), clarification/ballooning of hepatocytes (0: none; 1: not in all lobules/nodules; 2: in all lobules/nodules), Mallory bodies (0: none; 1:  $\leq 1$ /lobule or nodule; 2:  $\geq 2$ /lobule or nodule), neutrophil infiltrate (0: none; 1: isolated or rare; 2: marked). Steatosis was classified into five grades: 0: none; 1: mild (1% to 5% of hepatocytes); 2: moderate (6% to 32%); 3: marked (33% to 66%); and 4: severe (67% to 100%). Fibrosis was determined by a modified METAVIR score [2]: 0: no fibrosis; 1: pericentral and/or periportal fibrosis without fibrous septa; 2: pericentral and/or periportal fibrosis with few fibrous septa; 3: many fibrous septa without cirrhosis; and 4: cirrhosis. Patients were classified into three categories according to the presence and the severity or the absence of AH: i) severe AH (sAH,  $n=10$ ): score  $\geq 6$  and neutrophil infiltrate score  $\geq 1$ ; ii) non-severe AH: score  $< 6$  and  $> 2$  (nsAH,  $n=12$ ) or score  $\geq 6$  but without neutrophil infiltrate, iii) no AH (noAH,  $n=16$ ): score  $\leq 2$  or patients with normal aminotransferase levels and no evidence of cirrhosis (normal bilirubin level, prothrombin time  $>85\%$ , no liver dysmorphism, no sign of portal hypertension, no  $\beta\gamma$  block on protein electrophoresis).

### Animal experimentation: transfer of IM and alcohol feeding

*Humanization of germ-free mice and alcohol feeding.* Five-week old female germ-free C57BL/6J mice were used for the intestinal microbiota transplant experiment. These mice were born and raised at ANAXEM, the germ-free facilities of the Micalis Institute (INRA, Jouy-en-Josas, France). The mice were maintained in sterile isolators, and kept separate from germ-free breeding pairs.

Two groups of 15 mice were colonized by oral-gastric gavage with the diluted feces from an alcoholic patient: either a patient with severe alcoholic hepatitis (sAH-mice) or a patient with no evidence of alcoholic hepatitis (noAH-mice). Mice were housed in one independent germ-free isolator per group and maintained in individual cages throughout the experiment such that daily food intake could be monitored for each animal. Two weeks after transfer of the microbiota, the mice were gradually adapted to the modified Lieber-DeCarli (LDC) diet (BioServ, Canada) provided by feeding tubes (BioServ, Canada). The diet was 35% (caloric content) fat (corn oil), 12% carbohydrate, 18% protein, and 35% isocaloric maltose dextrin mixed with ethanol (table S8). After one-week acclimation, the mice were adapted to ethanol by progressively increasing its concentration in their diet to 3%. Mice were then fed this diet containing 3% ethanol for five weeks, after which they were euthanized. Feces were collected two weeks after microbiota transfer, and immediately before euthanasia. *In vivo* intestinal permeability was assessed the day before euthanasia. At the time of

death, blood was collected from the retro-orbital lobe and serum was prepared and kept at -20°C. Sections of liver were prepared for histological analysis, gene expression assays, and characterization of immunocompetent cells. Sections of ileum were prepared for histological analysis, immunohistochemical staining of Muc2, FISH of translocating bacteria and gene expression assays. Visceral adipose tissue was dissected and prepared for the characterization of infiltrating immunocompetent cells. Mesenteric lymph nodes were snap frozen in liquid nitrogen for quantification of translocating bacteria and prepared for the characterization of infiltrating immunocompetent cells. Animal care was provided in accordance with National Institute of Health guidelines and with authorization 78-60 from the French Veterinary Services.

*Humanization of conventional mice and alcohol feeding.* To ensure the implantation of human intestinal microbiota into conventional mice, we developed a new protocol. Mice were fasted before oral gavage with the human microbiota. As mice are coprophagous, they were placed in clean cages, and 1h later, were subjected to intestinal purge by oral gavage with four doses of 1ml of polyethylene glycol, the doses separated by 20 minutes (PEG, Macrogol 4000, Fortrans, Ipsen Pharma, France). Four hours later, the mice received human intestinal microbiota by oral gavage with 300µl of a dilution of feces from a donor patient. Feces from patients were prepared as described above. After this human intestinal microbiota transplantation, mice were allowed access to food and water. To maintain the human microbiota in mice, 300µl of dilutions of patient feces was administered twice a week throughout the experiments.

Eight-week old mice were fed for 21 days with a liquid diet adapted from Lieber-DeCarli, as described by Gustot et al. [3], Ki et al. [4] and based on the NIAAA model [5]. Briefly, the ethanol diet was obtained by adding absolute ethanol to a solution of a Lieber-DeCarli powder (Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) in filtered water. After a 7-day adaptation to the animal facility and a 7-day adaptation to the semi-liquid diet, mice were given increasing ethanol concentrations for 7 days (1% increase every two days). The final concentration of ethanol in this liquid diet was 5% (vol/vol), such that ethanol accounted for 28% of the total caloric intake. The control diet was obtained by replacing the ethanol by an isocaloric amount of maltodextrin (Maldex 150, safe, France). Alcoholized groups were allowed free access to the 5% (vol/vol) ethanol diet for 7 days. Control mice were pair-fed with the isocaloric control diet throughout the entire feeding period.

### **Histological studies**

Livers were fixed overnight in 4% paraformaldehyde and then embedded in paraffin. Paraffin sections (4 µm thick) were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Immunohistochemical staining was done with paraffin sections using Abs against Mucin 2 (H-300) (SC-15334, Santa Cruz Biotechnology, Tébu-bio SAS, France) and the pan-T cell marker CD3 (3256-1, Epitomics, Burlingame, California). The sections were washed and incubated with an appropriate biotinylated secondary Ab and then with streptavidin-horseradish peroxidase complex (LSAB kit, Dako France, Trappes, France). Sections were then counterstained with hematoxylin. Negative controls involved following the same procedure with omission of the primary Ab. Images were obtained using a Leica DMLA microscope (Leica Microsystems) equipped with Fluostar optic objectives, at the indicated magnification, and were digitized directly with a Leica camera DFC 450C and kit software. Steatosis was assessed semi-quantitatively and classified into five grades: none = 0; mild = 1 (1% to 5% of hepatocytes); moderate = 2 (6% to 32%); marked = 3 (33% to 66%); and severe = 4 (67% to 100%). Necrosis was classified as absent (score 0) or present (score 1).

Intestinal disease in recipient mice was assessed by evaluating necrosis, inflammation, and the Muc2 production by the mucus layer. Sections were scored on a 0–4 scale for necrosis as follows: 0: no necrosis, 1: focal necrosis at the top of villi, 2: diffuse necrosis at the top of villi, 3: total necrosis of villi with crypt conservation, 4: total necrosis of mucosa. We applied a semi-quantitative scale to score inflammation as follows: 0: no infiltrate, 1: slight infiltrate, 2: moderate infiltrate. The mean scores for these various pathological features were summed for each mouse group to obtain a final necroinflammation score. Muc2 production by goblet cells was semi-quantified according to the area of positive Muc2 immunostaining. At least six high-power fields were assessed; 0: Muc2-positive area ≤ 10%, 1: Muc2-positive area ≤ 50%, 2: Muc2-positive area > 50%.

### **Assessment of liver enzymes**

Liver alanine aminotransferase (ALT) activity in serum was assayed by a spectrophotometric method (Olympus, AU400).

### **Characterization of inflammatory cells by flow cytometry**

Lymphocytes were isolated from mouse liver by a 2-step perfusion procedure. First, circulating cells were quantified and their cell surface antigens were examined as described previously [6]. Non parenchymatous cells were stained with the following antibodies: V500-conjugated rat anti-CD45 monoclonal Ab, PE-conjugated hamster anti-CD3

monoclonal Ab; FITC-conjugated rat anti-CD8b2 monoclonal Ab; APC-conjugated mouse anti-NK1.1 monoclonal Ab; and V450-conjugated rat anti-CD4 monoclonal Ab (Pharmingen, San Diego, California). Results were analyzed with a Fortessa LSR-II machine (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, New Jersey).

***Analysis of the gut microbiota composition by Fluorescent in situ Hybridization combined with Flow Cytometry (FISH-FCM)***

Fecal samples were collected at various times from alcoholic patients and from mice fed an alcohol diet. Samples were fixed as previously described [7]. A set of 12 probes (Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, Germany) targeting bacterial 16S rRNA was used to assess the relative proportions of intestinal bacteria from different phylogenetic groups with respect to the total bacteria assessed by an universal bacterial probe (Table S7). FISH-FCM was performed as described previously [7].

***Microbiota composition and diversity***

Microbiota composition was deeply analyzed using 454 pyrosequencing targeting the 16S rDNA V3-V4 region (V3fwd: 5' TACGGRAGGCAGCAG 3', V4rev: 5' GGACTACCAGGTATCTAAT 3'). A total of 22 DNA samples, corresponding to the two fecal samples from human donors used for inoculation, and fecal samples from 10 recipient mice per microbiota were sequenced at Genoscreen (Genoscreen, Lille, France) using GS-FLX-Titanium technology. Sequences were trimmed for adaptors and PCR primers removal and binned for a minimal sequence length of 300 bases, a maximum homopolymers length of 6, a minimal base quality threshold set at 27 and a maximum of 15% tolerated low quality bases and N on the overall sequence length. Using QIIME, sequences were further clustered in at 97% of identity in OTUs using cdhit and representative sequences were assigned to different taxonomic levels (from phylum to genus) using the RDP database (release 10, update 26). OTUs were assigned to closest taxonomic neighbors and relative bacterial species using SEQMATCH and up-to-date 16S rRNA gene RDP database. Estimates of phylotypes richness and diversity were calculated using both Shannon and Simpson indices on the rarefied OTU table (1 000 sequences). All statistical analyses were performed using R program and ade4 package (Package ade4; <http://pbil.univ-lyon1.fr/ADE-4/>). Wilcoxon test was applied to assess statistical significance in bacterial composition between the different samples. Based on inter-class PCA, statistical p-values of the link between the different mice groups and bacterial genus microbial profiles was assessed using a Monte-Carlo rank test (1000 replicates). The Monte-Carlo test is a multivariate and non parametric test based on random permutations. This asymptotically equivalent

permutation test is created when there are too many possible orderings of the data to allow complete enumeration in a convenient manner. The Monte-Carlo sampling takes a small (relative to the total number of permutations) random sample of the possible replicates and test the null hypothesis that there are no significant differences in genus distribution between the different defined groups. When the Monte-Carlo test p-value is less than 0.05, one can confidently reject the null hypothesis that observed distribution between different classes is due to random observation.

***Gene Expression Assays***

RNA extraction and quality control Total RNA was extracted from the ileum of recipient mice using the mirVana miRNA isolation kit according to the manufacturer's instructions (Ambion, France). Total RNA was extracted from the liver of recipient mice using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. For all samples, RNA quantity was assayed with a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, France). The quality of RNA was assessed by determining the RNA Integrity Number (RIN) on a Eukaryote RNA Nano Chip with a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

Reverse transcription Total RNA was reverse transcribed with the High capacity cDNA Reverse Transcription (RT) kit (Applied Biosystems, Foster City, California) according to the manufacturer's instructions.

Taqman low density array (TLDA)-based qRT-PCR. ABI microfluidic TLDA (Applied Biosystems, Foster City, CA) were designed to quantify mRNA transcribed from 48 genes that are either involved in metabolism (lipid, alcohol) or in inflammation and were used to assess gene expression in 10 ileum samples. For liver samples, two different types of array cards were used; one comprised 48 target genes, used for eight samples and the other 96 target genes, used for four samples (see supplementary data for target genes). TLDA array cards were prepared and used as indicated in the manufacturer's instructions. An ABI Prism 7900HT Sequence Detection System with SDS Software 2.4 was used for thermal cycling and fluorescence detection.

Data analysis The raw data from the Prism 7900HT Sequence Detection System was imported into RQ manager v1.2.1 (Applied Biosystem, Foster City, California) to verify amplification and threshold values. GenEx v5.4.0.513 (MultiD Analyses AB, Gothenburg, Sweden) software was used for statistical analysis and for calculation of optimal endogenous controls. Quantification and expression data were processed with suitable reference genes

(RG) for normalization. Reference genes were evaluated by Cq stability and variability testing using the GenNorm and Normfinder algorithms. The geometric mean of two RG was used as the reference index. *Gapdh* and *Hprt* were used to normalize the 96 Assay TLDA (liver samples). For the liver sample 48 Assay TLDA, *Gapdh* and *Ubc* were used for normalization. For the ileum sample 48 Assay TLDA *Hprt1*, *ActB*, and *Ubc* were used. The Rq model was used for normalization and thus relative quantification [8]. Statistical significance was determined by the Mann-Whitney test, (\* $P < 0.05$ ).

**MIQE Guidelines** All experiments were carried out according to the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) guidelines [9].

### Metabolomics

The fecal metabolome was analyzed by a liquid chromatography-mass spectrometry based procedure as previously described [10]. Preparation was performed at 4°C. Fecal samples were diluted 1:60 in 50mM phosphate buffer (pH 8), and centrifuged. The supernatant (*i.e.* fecal water) was collected and acidified to pH 4.5 using 0.1% formic acid in water. Then, fecal water samples were subjected to SPE chromatography (solid phase extraction with cation exchange process) and eluted with methanol. The eluate was used directly for LC/MS analyses. After spectral acquisition on LC/Q-ToF (high resolution mass spectrometry using quadrupole - time of flight mass selection), data extraction was performed using the XCMS R package. Multivariate analyses with SIMCA-P software (Umetrics, Umeå, Sweden) were used to study the resulting matrix. After the first PCA and PLS-DA filtering, variables important in the projection (VIPs) were isolated for another PLS-DA modeling, hierarchical clustering (HCA) [11] and identification using online databases (MZedDB, METLIN).

### REFERENCES

- 1 Williams GD, Proudfit AH, Quinn EA, *et al.* Variations in quantity-frequency measures of alcohol consumption from a general population survey. *Addiction* 1994;89:413-20.
- 2 International Group. Alcoholic liver disease: morphological manifestations. *Lancet* 1981;1:707-11.
- 3 Gustot T, Lemmers A, Moreno C, *et al.* Differential liver sensitization to Toll-like receptor pathways in mice with alcoholic fatty liver. *Hepatology* 2006;43:989-1000.
- 4 Ki SH, Park O, Zheng M, *et al.* Interleukin-22 treatment ameliorates alcoholic liver injury in a murine model of chronic-binge ethanol feeding: role of signal transducer and activator of transcription 3. *Hepatology* 2010;52:1291-300.
- 5 Bertola A, Mathews S, Ki SH, *et al.* Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). *Nat Protoc* 2013;8:627-37.
- 6 Bigorgne AE, Bouchet-Delbos L, Naveau S, *et al.* Obesity-induced lymphocyte hyperresponsiveness to chemokines: a new mechanism of Fatty liver inflammation in obese mice. *Gastroenterology* 2008;134:1459-69.
- 7 Gerard P, Beguet F, Lepercq P, *et al.* Gnotobiotic rats harboring human intestinal microbiota as a model for studying cholesterol-to-coprostanol conversion. *FEMS Microbiol Ecol* 2004;47:337-43.
- 8 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-8.
- 9 Bustin SA, Benes V, Garson JA, *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55:611-22.
- 10 Respondek F, Gérard P, Bossis M, *et al.* Short-chain fructo-oligosaccharides modulate intestinal microbiota and metabolic parameters of humanized gnotobiotic diet induced obesity mice. *PloS one* 2013;8:e71026.
- 11 Caraux G, Pinloche S. PermutMatrix: a graphical environment to arrange gene expression profiles in optimal linear order. *Bioinformatics* 2005;21:1280-1.

## II. Annexe 2

### **Obesity is associated with a downregulation of the glucocorticoid receptor-GILZ pathway in Kupffer cells which promotes liver inflammation in mice.**

*Olivier Robert<sup>1,2\*</sup>, Hédia Boujedidi<sup>1,2\*</sup>, Amélie Bigorgne<sup>1,2</sup>, **Gladys Ferrere<sup>1,2</sup>**, Cosmin Sebastian Voican<sup>3</sup>, Sabine Hübner<sup>4</sup>, Jan Peter Tuckermann<sup>4</sup>, Laurence Bouchet-Delbos<sup>1</sup>, Thi Tran<sup>1</sup>, Patrice Hemon<sup>1</sup>, Virginie Puchois<sup>1,2</sup>, Ibrahim Dagher<sup>2,5</sup>, Richard Douard<sup>6</sup>, Françoise Gaudin<sup>1,7</sup>, Hélène Gary-Gouy<sup>7</sup>, Francis Capel<sup>1</sup>, Ingrid Durand-Gasselin<sup>1</sup>, Sophie Prévot<sup>8</sup>, Sophie Rousset<sup>1</sup>, Sylvie Naveau<sup>3</sup>, Véronique Godot<sup>1,2</sup>, Dominique Emilie<sup>1,2,†</sup>, Marc Lombès<sup>2,9,8,10</sup>, **Gabriel Perlemuter<sup>1,2,3\*\*</sup>**, Anne-Marie Cassard-Doulcier<sup>1,2\*\*</sup>*

*Accepté dans Journal of Hepatology en Novembre 2015*





Ce travail traite de la protéine GILZ (pour l'anglais *Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper*), qui est exprimée dans les monocytes / macrophages, donc dans la KC. Cette protéine qui est induite par le récepteur de glucocorticoïde (GR) est impliquée dans plusieurs processus inflammatoires. L'hypothèse émise dans ce travail est que l'axe GR-GILZ dans les KC peut contribuer à la physiopathologie de l'inflammation hépatique induite par l'obésité.

Dans ce contexte, des cultures de cellules primaires, avec ou sans composés pharmaceutiques induisant GILZ ont été utilisées. Pour les études *in vivo*, des souris déficientes pour le GR et des souris transgéniques surexprimant GILZ, toutes deux spécifiquement dans les macrophages, ont été utilisées et une obésité a été induite. Des traitements inhibant le récepteur de la GR ont été utilisés chez ces souris.

L'obésité a été associée à une régulation négative du GR et une diminution de l'induction de la protéine GILZ dans la KC. L'inhibition de l'expression de GILZ dans la KC isolée transfectée avec un siRNA démontrait que la régulation négative de GILZ était suffisante pour sensibiliser la KC au LPS. Inversement, les souris obèses transgéniques surexprimant GILZ spécifiquement dans les macrophages présentaient une diminution de l'inflammation hépatique. L'inhibition pharmacologique du GR a montré que l'expression de GILZ dans la KC induit par le LPS était également diminuée dans l'obésité. Chez les souris déficientes pour le GR spécifiquement dans les macrophages, l'expression de GILZ était faible, conduisant à une exacerbation de l'inflammation du foie induite par l'obésité.

L'obésité est associée à une régulation négative de l'axe GR- GILZ dans les cellules de Kupffer, ce qui favorise l'inflammation du foie. L'axe GR-GILZ dans la KC est une cible importante pour la régulation de l'inflammation du foie dans l'obésité.

***Dans ce travail, j'ai participé à différentes expérimentations. J'ai effectué les western blots pour l'expression de GILZ des souris transgéniques. Mes connaissances et mon expérience avec les KC m'ont permis d'isoler les KC dans les différents modèles de souris utilisées. Pour finir, j'ai participé aux expériences pour le reviewing du papier qui consistaient en l'isolement du foie et des KC de souris obèses en vue de doser de nouvelles cibles de l'inflammation.***



## Obesity is associated with a downregulation of the glucocorticoid receptor-GILZ pathway in Kupffer cells which promotes liver inflammation in mice.

Olivier Robert<sup>1,2\*</sup>, Hédia Boujedidi<sup>1,2\*</sup>, Amélie Bigorgne<sup>1,2</sup>, **Gladys Ferrere<sup>1,2</sup>**, Cosmin Sebastian Voican<sup>3</sup>, Sabine Vettorazzi<sup>4</sup>, Jan Peter Tuckermann<sup>4</sup>, Laurence Bouchet-Delbos<sup>1</sup>, Thi Tran<sup>1</sup>, Patrice Hemon<sup>1</sup>, Virginie Puchois<sup>1,2</sup>, Ibrahim Dagher<sup>2,5</sup>, Richard Douard<sup>6</sup>, Françoise Gaudin<sup>1,7</sup>, Hélène Gary-Gouy<sup>7</sup>, Francis Capel<sup>1</sup>, Ingrid Durand-Gasselin<sup>1</sup>, Sophie Prévot<sup>8</sup>, Sophie Rousset<sup>1</sup>, Sylvie Naveau<sup>3</sup>, Véronique Godot<sup>1,2</sup>, Dominique Emilie<sup>1,2,†</sup>, Marc Lombès<sup>2,9,8,10</sup>, Gabriel Perlemuter<sup>1,2,3\*\*</sup>, Anne-Marie Cassard<sup>1,2\*\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM UMR996 - Inflammation, Chemokines and Immunopathology, Clamart, France. <sup>2</sup>Univ Paris-Sud, Univ Paris-Saclay, DHU Hepatov, Labex Lermite, Kremlin-Bicêtre, France. <sup>3</sup>AP-HP, Hôpital Antoine Bécère, Service d'hépatogastroentérologie, Clamart, France. <sup>4</sup>Institute of Comparative Molecular Endocrinology (CME), Ulm University, 89081 Ulm, Germany. <sup>5</sup>AP-HP, Hôpital Antoine Bécère, Service de chirurgie minimale invasive, DHU Hépatov, Clamart, France. <sup>6</sup>AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de chirurgie, Paris, France. Present address: AP-HP, Hôpital Avicenne, Service de chirurgie, Bobigny, France. <sup>7</sup>IFR 141 Institut Paris-Sud d'Innovation Thérapeutique, Châtenay-Malabry, France. <sup>8</sup>AP-HP, Hôpital Antoine Bécère, Service d'anatomie pathologique, Clamart, France. <sup>9</sup>INSERM, U693, Le Kremlin-Bicêtre, France. <sup>10</sup>AP-HP, Hôpital Bicêtre, Service d'Endocrinologie et Maladies de la Reproduction, Le Kremlin-Bicêtre, France.

<sup>†</sup>In memoriam <sup>\*</sup>HB and OR contributed equally to this work. <sup>\*\*</sup>GP and AMCD contributed equally to this work and are co-corresponding authors

### ABSTRACT

**Background & Aim.** Kupffer cells (KC) play a key role in the onset of inflammation in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). The glucocorticoid receptor (GR) induces glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) expression in monocytes/macrophages and is involved in several inflammatory processes. We hypothesized that the GR-GILZ axis in KC may contribute to the pathophysiology of obesity-induced liver inflammation.

**Methods.** By using a combination of primary cell culture, pharmacological experiments, mice deficient for the GR specifically in macrophages and transgenic mice overexpressing GILZ in macrophages, we explored the involvement of the GR-GILZ axis in KC in the pathophysiology of obesity-induced liver inflammation.

**Results.** Obesity was associated with a downregulation of the GR and GILZ, and an impairment of GILZ induction by lipopolysaccharide (LPS) and dexamethasone (DEX) in KC. Inhibition of GILZ expression in isolated KC transfected with GILZ siRNA demonstrated that GILZ downregulation was sufficient to sensitize KC to LPS. Conversely, liver inflammation was decreased in obese transgenic mice specifically overexpressing GILZ in macrophages. Pharmacological inhibition of the GR showed that impairment of GILZ induction in KC by

LPS and DEX in obesity was driven by a downregulation of the GR. In mice specifically deficient for GR in macrophages, GILZ expression was low, leading to an exacerbation of obesity-induced liver inflammation.

**Conclusion.** Obesity is associated with a downregulation of the GR-GILZ axis in Kupffer cells, which promotes liver inflammation. The GR-GILZ axis in KC is an important target for the regulation of liver inflammation in obesity.

**Keywords :** Glucocorticoid receptor; glucocorticoid-induced leucine zipper; obesity; liver; inflammation; Kupffer cells.

Received July 2015, revised October 2015, accepted in November 2015. Soon available online.

\*Corresponding authors. address : INSERM UMR\_S996 32, rue des Carnets, 92140 Clamart, France.

E-mail : cassard.doulcier@u-psud.fr (Dr. CASSARD)

### List of abbreviations

NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease, KC: Kupffer cells, NASH: non-alcoholic steatohepatitis, LPS: lipopolysaccharide, DEX: dexamethasone, GILZ: glucocorticoid-induced leucine zipper, NF-κB: nuclear factor-κB, AP-1: activator protein 1, GR: glucocorticoid receptor, GILZ-Tg mice: GILZ transgenic mice, non-Tg mice: non transgenic mice, HFD: high-fat diet, BMDM: bone marrow-derived macrophages, siRNA: small interfering RNA, RT-PCR: real-time quantitative polymerase chain reaction, CCL: CC chemokine ligands, Ab: Antibody, GC: glucocorticoids, 11β-HSD1: 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, GRE: glucocorticoid responsive element

## INTRODUCTION

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the main causes of liver disease in western countries. Recruitment and activation of inflammatory cells into the liver appears to be key to the progression of liver disease from steatosis to advanced liver disease [1].

Resident macrophages of the liver, Kupffer cells (KC), play a key role in the onset of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) [2]. Increased intestinal permeability and tight junction abnormalities in NAFLD lead to circulation of gut-derived lipopolysaccharide (LPS) in the portal vein inducing KC activation [3]. Their immune phenotype can lead to production of proinflammatory cytokines and chemokines thereby regulating liver inflammation [4, 5] or improve metabolic syndrome and type 2 diabetes [6]. Obese mice display an enhanced sensitivity to endotoxin-induced lethality, and we have shown that LPS induces recruitment of B and T lymphocytes into the liver of obese mice [7].

A comparison of cDNAs from untreated and dexamethasone (DEX)-treated murine T cells led to the identification of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ), a new member of the leucine zipper family [8]. GILZ is produced in healthy subjects by cells of the monocyte/macrophage lineage [9], which includes KC [10], and inhibits the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and activator protein 1 (AP-1) inflammatory pathways [11, 12]. Moreover, GILZ inhibits the production of CCL-3 and CCL-5 in the THP-1 monocytic cell line challenged by LPS [9].

As a consequence, we hypothesized that GILZ expression in KC, and its inducer, the glucocorticoid receptor (GR), may contribute to the pathophysiology of NAFLD. By using a combination of primary cell culture, pharmacological experiments, transgenic mice overexpressing GILZ in macrophages and mice specifically deficient in the GR in macrophages, we demonstrated that a downregulation of the GR-GILZ axis in KC is directly responsible for an increased secretion of proinflammatory cytokines and chemokine in the liver of obese mice. Our study provides the first evidence that in obesity, *GILZ* and *GR* expression in the liver and specifically in KC participates to the liver inflammatory process in obesity.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### ***Generation of mice overexpressing GILZ in macrophages***

The hCD68 promoter was recovered from pDRIVE03-CD68(h) (Invivogen, Toulouse, France), and the enhancer HIVS1 was amplified from human DNA using the sequence previously described [13]. The transgene construct was made by inserting a 2000-base-pair cDNA fragment containing hCD68-HIVS1-GILZ into the pCDNA3 expression vector (**Fig S1.A**). The construct was injected into fertilized C57BL/6 mouse embryos. Mice overexpressing GILZ (GILZ-Tg) in CD68 expressing cells (mainly corresponding to monocyte/macrophage lineage) were compared with control littermates (non-Tg). Two independent transgenic lines were produced (L2 and L10).

### ***Generation of mice lacking GR in macrophages***

Mice lacking GR in LysM expressing cells ( $GR^{LysMCre}$ ) and control littermates ( $GR^{flox}$ ) were obtained as described previously [14].

### ***Experiments on mice***

All mice were treated in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 1996). They were fed a standard diet consisting of 4.3% lipid and 70% carbohydrate (Altromin, Lage, Germany), or a high fat diet (HFD) consisting of 60% lipid, and 20% carbohydrate (SSNIFF, Soest, Germany), all supplied *ad libitum*.

Five-week-old male C57BL/6 *ob/ob* mice and lean littermates were purchased from Janvier (Le Genest St. Isle, France). "Non-obese *ob/ob*" mice were supplied daily with the same caloric intake as lean controls, and experiments were performed on 12-week-old mice as described previously [7]. Twelve-week-old C57BL/6 mice were purchased from Janvier.

Experiments on GILZ-Tg and non-Tg mice fed a HFD were performed after 16 weeks of diet.

Experiments on  $GR^{LysMCre}$  and  $GR^{flox}$  mice fed a HFD were performed after 24 weeks of diet.

All mice were anesthetized with xylazine (Rompun 2%, Centravet, Maisons-Alfort, France) and ketamine (Imalgene, Centravet, Maisons-Alfort, France) before sacrifice.

Glucose sensitivity was assessed by an oral glucose

Robert O. et al

tolerance test (OGTT). The glucose load (2 g/kg) was given by gavage after 6hr of fasting and blood samples were taken from the tail vein at 0, 15, 30, 60, 90 and 120min after the gavage. Serum glucose concentrations were determined by the Accu-Chek® Performa (Roche, Switzerland) and the area under the glucose–time curve was calculated.

### Cell culture

KC were isolated, cultured and plated at  $10^6$ /mL of medium isolated cells as described previously [4]. Cell viability was evaluated by trypan blue staining. Bone marrow-derived macrophages (BMDM) were generated from bone marrow cells from GILZ-Tg and non-Tg littermate mice. The cells were washed with serum-free RPMI 1640 medium and the resultant bone marrow cells were incubated at  $3.10^6$  cells/well in RPMI 1640 medium supplemented with 15% L-CSF, 10% SVF, 2% penicillin/streptomycin for 3 days. Non-adherent cells were removed on day 5, and the BMDM were harvested. LPS treatment were performed by adding LPS 0.1 µg/mL from *E. coli* serotype O55: B5 (Alexis, Lausen, Switzerland) during 24 hours, then supernatant were recovered.

### Inhibition of GILZ expression

*GILZ* expression was inhibited by transfecting KC with small interfering RNAs (siRNAs) specific for the *GILZ* gene; KC ( $2.10^5$  cells/well) were transfected with 2 µg/well of *GILZ* siRNA or control siRNA (Qiagen, Courtabœuf, France) by the lipofectamine method using X-tremeGENE siRNA transfection reagent according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics, Meylan, France). The sequences of the siRNA were the following: *GILZ* siRNA, 5'-CGC CAA AGC CUA UCC UAU AdTdT-3'; control siRNA with no known specificity, 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UdTdT-3'. Six hours after transfection, the culture medium was removed and the cells were cultured for 24 hours in the presence or absence of 1 µg/mL LPS from *E. coli* serotype O55: B5 in RPMI, 10% SVF, 1 mM HEPES and 1% penicillin/streptomycin. Then, the cells and the supernatants were collected.

### Quantification of transcripts in the liver and KC

Total RNA was extracted from KC using RNeasy Plus Mini kit and total RNA from liver was extracted using RNeasy Lipid Tissue Mini kit

(Qiagen, Courtabœuf, France) referring to manufacturer's protocol. Up to 5µg of total RNA were reverse transcribed by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) with random hexamers or poly-d(T)<sub>15</sub> (Roche Diagnostics, Meylan, France).

*GILZ*, *CCL-2* and *IL-6* mRNA were quantified by quantitative real-time PCR (RT-PCR) on a LightCycler® 480 Instrument using the DNA Master SYBR® Green kit (Roche Diagnostics) as described previously [10]. Values were normalized to those for *18S* rRNA and are expressed as a fold increase of the *GILZ* or *CCL-2* or *IL-6* mRNA /*18S* rRNA ratio. *GR* mRNA was assayed by semi-quantitative RT-PCR as described previously [15]. Results were normalized to those for *18S* rRNA and are expressed as a fold increase of the *GR* mRNA/*18S* rRNA ratio. The primers used were the following: *GILZ* forward 5'-CAG CAG CCA CTC AAA CCA GC-3', reverse 5'-ACC ACA TCC CCT CCA AGC CAG-3'; *CCL-2* forward 5'-AGG TCC CTG TCA TGC TTC TG-3', reverse 5'-TCT GGA CCC ATT CCT TCT TG-3'; *IL-6* forward 5'-GTT CTC TGG GAA ATC GTG GA-3', reverse 5'-TGT ACT CCA GGT AGC TAT GG-3'; *GR* forward 5'-TTC TGT TCA TGG CGT GAG TAC C-3', reverse 5'-CCC TTG GCA CCT ATT CCA GTT-3'; *11β-HSD1* forward 5'-CCT TGG CCT CAT AGA CAC AGA AAC-3', reverse 5'-GGA GTC AAA GGC GAT TTG TCA-3'; *18S* forward 5'-GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT-3', reverse 5'-CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG-3'.

### Western blot analysis

Cells were lysed and proteins were separated as described previously [16]. Primary rabbit polyclonal antibody (Ab) recognizing *GILZ* was provided by M. Pallardy (INSERM U996, Châtenay-Malabry, France). An anti-Lamin A monoclonal Ab (Santa Cruz biotechnology, USA) was used as a control. Scan Analysis software (Biosoft, Cambridge, United Kingdom) was used for densitometric analysis.

### Quantification of secretion

Cytokine and chemokine concentrations were determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantikine® kits (R&D systems Europe, Lille, France).

Robert O. et al

### Quantification and phenotyping of lymphocytes infiltrating the liver

Lymphocytes were isolated from mouse liver by a 2-step perfusion procedure and were quantified and phenotyped as described previously [7]. Lymphocytes were stained with PE-conjugated rat anti-CD4 monoclonal Ab; FITC-conjugated rat anti-CD8 monoclonal Ab; APC-conjugated rat anti-CD19, mouse anti-NK1.1 monoclonal Abs; and PerCP-Cy5.5-conjugated hamster anti-CD3 monoclonal Ab (Pharmingen, San Diego, CA). Results were analyzed by 4-color flow cytometry, using a FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA).

### DEX or LPS stimulation and GR inhibition

10µg/g DEX in peanut oil (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) or 0.5µg/g LPS in PBS were injected intraperitoneally. Mice were sacrificed 4 hours after DEX stimulation or 24 hours after LPS stimulation.

GR was inhibited 1h prior to DEX or LPS stimulation with 100µg/g RU486 in peanut oil (mifepristone, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) injected intraperitoneally. 100µg/g RU486 was given 12h after LPS stimulation to ensure GR inhibition.

### Statistical analysis

All graphs show means ± SEM. Quantitative data were compared using non-parametric Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis *post-hoc* ANOVA Fisher's PLSD test. Two sided tests were performed and only *P*-values<0.05 were considered significant. A spearman rank correlation test was used to correlate *GILZ* expression and the NAFLD activity score (NAS) in liver biopsies of patients.

## RESULTS

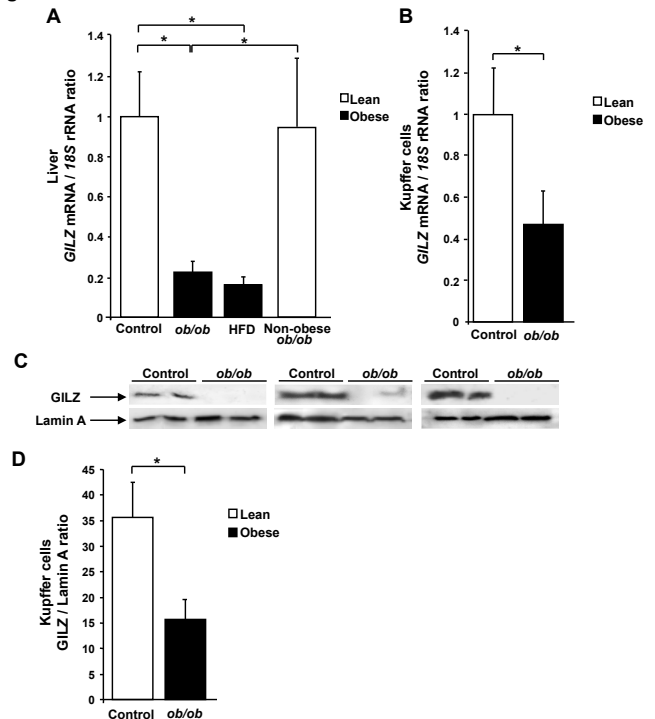
### *GILZ* expression is decreased in the liver and in Kupffer cells in obesity.

We investigated *GILZ* expression level in obesity. To this end, and to study the contribution of obesity itself and not leptin-deficiency, we compared *GILZ* expression in livers of obese (*ob/ob* and HFD-fed mice) and lean mice (non-obese *ob/ob* fed with a controlled caloric intake, and control diet-fed mice, respectively). Of note, at the age of 12 weeks, non-obese *ob/ob* mice showed a similar weight to that of lean controls (data not shown). We found that *GILZ* expression was reduced in the liver of both *ob/ob* and HFD-fed

mice but not in lean mice (Fig. 1.A). To assess the relevance of our results to human NAFLD, we evaluated *GILZ* expression in the liver of 25 consecutive hospitalized patients with NAFLD. All these patients had histological liver abnormalities characteristic of NAFLD. Liver biopsies were classified according to the NAFLD activity score (NAS) [17]. There was a negative correlation between the *GILZ* expression level and the severity of NAS ( $r^2=0.169$ ;  $p<0.05$ ) (Fig. 1.B). We tested the robustness of this association using a logarithmic scale for *GILZ* expression level and Spearman's test and a similar association was found.

KC in healthy liver from lean mice express the *GILZ* gene [10]. Therefore, we explored whether the weak *GILZ* expression in the liver of obese mice was associated with a specific decreased expression in KC. *GILZ* mRNA and protein were less abundant in KC from *ob/ob* mice than those from controls (Fig. 1.C, 1.D, 1.E). Overall, these results show that *GILZ* expression is reduced in obesity in the whole liver and specifically in KC. Of note, the decreased expression of *GILZ* was specific to the liver in obese mice as it was not altered in white adipose tissue (Supplemental Fig. S2.A).

Figure 1



**Figure 1. *GILZ* expression is decreased in liver and Kupffer cells.** (A) *GILZ* expression in livers of lean (white boxes) and obese (black boxes) mice. (B) *GILZ* expression in livers from obese patients (n=25). The severity of liver disease was assessed according to the NAFLD activity score (NAS). Spearman rank correlation test. (C) *GILZ* expression in KC isolated from the livers of lean (white boxes) and obese (black boxes) mice (n=5). (D) Selected details of western blots showing *GILZ* and Lamin A expression in KC isolated from the livers of obese *ob/ob* mice and lean littermates. (E) Densitometric quantification of western blots showing *GILZ* expression level in KC isolated from obese *ob/ob* (black box) mice and lean littermates (white box). Results are expressed as a ratio of *GILZ* expression level normalized to Lamin A expression level (n=6). \*  $p<0.05$

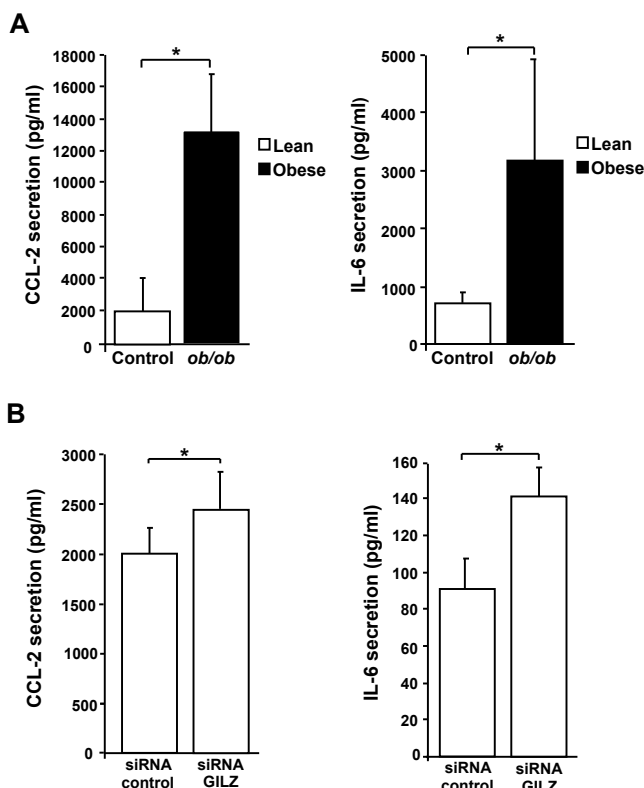


## GILZ downregulation induces sensitization of Kupffer cells to LPS

The increased sensitivity of fatty liver to LPS depends specifically on the ability of KC to secrete cytokines and chemokines [1]. We therefore isolated KC and measured the secretion of CCL-2 and IL-6 in response to LPS challenge. Secretion of CCL-2 and IL-6 by KC from obese mice was higher than that by KC from lean mice (Fig 2.A).

Consequently, we tested whether the decreased *GILZ* expression in KC from obese mice was directly responsible for the exacerbated sensitivity to LPS. We specifically inhibited *GILZ* expression in KC from lean mice using a siRNA strategy. Transfection of KC with the *GILZ* siRNA reduced *GILZ* mRNA expression by more than 80% (data not shown). We then quantified CCL-2 and IL-6 secretion upon LPS stimulation by KC transfected with *GILZ* siRNA or control siRNA. KC transfected with *GILZ* siRNA produced more CCL-2 and IL-6 than controls (Fig 2.B). These results provide a direct and negative link between *GILZ* expression and LPS-induced cytokine secretion by KC.

Figure 2

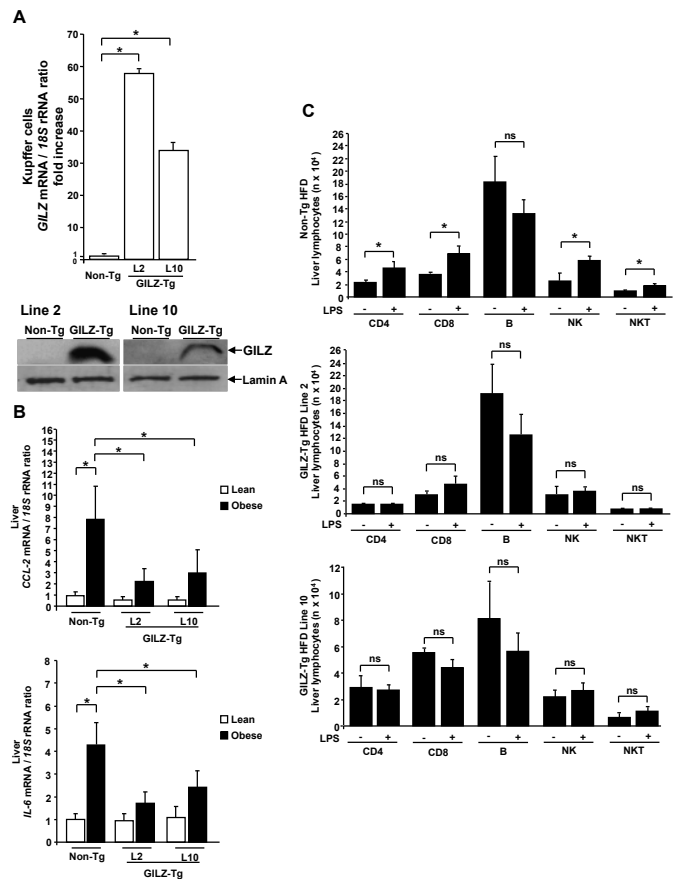


**Figure 2. *GILZ* expression modulates secretions of CCL-2 and IL-6 in Kupffer cells.** (A) CCL-2 and IL-6 secretion after 24 hours of LPS stimulation in KC isolated from livers of obese *ob/ob* (black boxes) mice and lean littermates (white boxes) (n=4). (B) CCL-2 and IL-6 secretion after 24 hours of LPS stimulation in KC isolated from livers of C57Bl/6 WT lean mice and transfected with siRNA targeting *GILZ* or siRNA control (n=6). \* p<0.05

## GILZ overexpression in KC reduces liver inflammation.

Conversely, we tested whether an increased expression of *GILZ* in KC prevents liver inflammation. We generated transgenic mice overexpressing *GILZ* (*GILZ*-Tg) in the monocyte/macrophage lineage under the control of the CD68 promoter (mainly corresponding to monocytes and macrophages). Two independent *GILZ*-Tg lines (line 2 and line 10) were used. Their characteristics are described in the supplemental section (Supplemental Fig. S1, S2, S3, S4 and Supplemental Table 1). These mice overexpress *GILZ* in KC at the mRNA and protein levels (Fig. 3.A).

Figure 3



**Figure 3. *GILZ* overexpression in Kupffer cells reduces obesity-related liver inflammation in mice.** (A) *GILZ* expression in KC isolated from the livers of non-Tg, line 2 (L2) and line 10 (L10) *GILZ*-Tg mice (n=3 for non-Tg mice and n=5 for *GILZ*-Tg mice). Selected details of western blots showing *GILZ* and Lamin A expression in KC isolated from the livers of *GILZ*-Tg and non-Tg mice. (B) Oral glucose tolerance test (OGTT) in *GILZ*-Tg and non-Tg mice (n=5) (C) CCL-2 and IL-6 expression in the livers of lean (white boxes) and obese (black boxes) *GILZ*-Tg and non-Tg mice (n=5-8). (D) Total count of lymphocytes present in the liver of *GILZ*-Tg and non-Tg mice fed HFD after LPS stimulation (n=3 for non-Tg mice and n=11 for *GILZ*-Tg mice). \* p<0.05 ; ns, not statistically significant.

Baseline level of blood glucose was similar in *GILZ*-Tg and control mice. However, glucose intolerance was improved after an HFD-induced obesity in the transgenic line that expressed the highest level of *GILZ* (Fig. 3.B).



Robert O. et al

GILZ-Tg mice were fed a HFD or a control diet during 16 weeks and liver inflammation was assessed. Induction of CCL-2 and IL-6 expression was reduced in the liver of GILZ-Tg fed a HFD in comparison with non-Tg mice (**Fig 3.C**). Moreover, TNF $\alpha$  secretion was also reduced in KC overexpressing GILZ after LPS challenge (**Supplemental Fig. S5.A**). Of note, there was no difference of CCL-2 and IL-6 expression in white adipose tissues in obese GILZ-Tg mice in comparison with non-Tg mice (**Supplemental Fig. S2.B, S2.C**). We then tested whether GILZ overexpression drives a specific phenotype of macrophages in basal conditions. As BMDM are recruited into the liver, we assessed the impact of GILZ overexpression in these cells, on the secretion of cytokines/chemokines. We did not find any difference in TNF $\alpha$ , IL-6, CCL2 and CCL5 secretion in BMDM overexpressing GILZ. However, after a 24-hour LPS stimulation, there was a decrease of TNF $\alpha$ , IL-6 and CCL5 secretion in BMDM from GILZ-Tg mice (**Supplemental Fig. S5**). GILZ overexpression was also associated with a decreased number of CD11b<sup>+</sup> KCs in GILZ-Tg mice without changes in the number of CD68<sup>+</sup> KCs (**Supplemental Fig. S6**). Moreover, there was also a decrease number of CD11b<sup>+</sup> BMDM (**Supplemental Fig. S5.F**).

We then challenged GILZ-Tg and non-Tg mice fed a HFD with LPS and assessed infiltration of lymphocytes into the liver. As previously published, flow cytometry was used to quantify immune cells within the liver [7]. LPS induced the recruitment of CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> T cells, NK and NKT cells into the liver of non-Tg mice fed a HFD (**Fig. 3.D**). However, no such recruitment was observed in GILZ-Tg mice fed a HFD and challenged with LPS (**Fig. 3.D**).

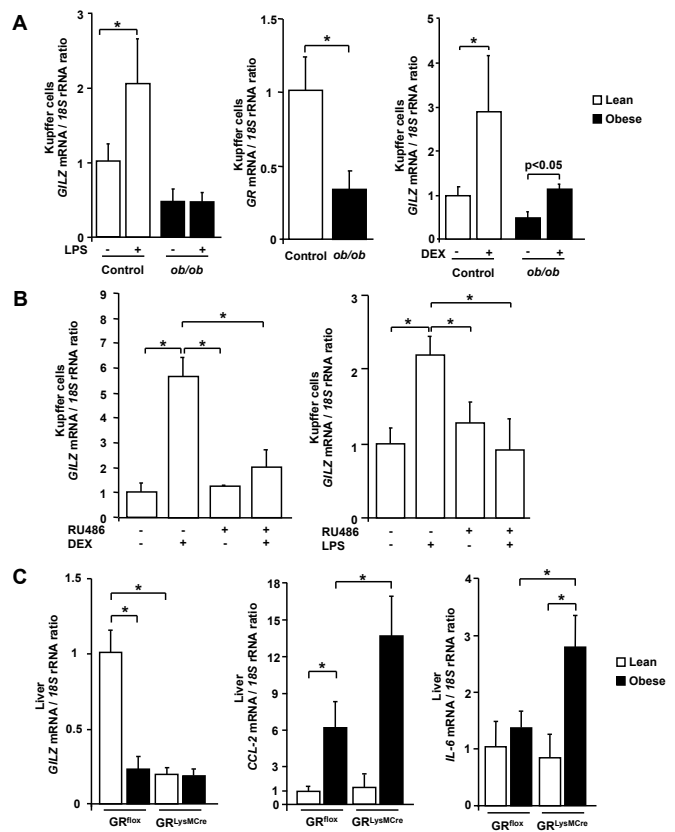
Overall, these results demonstrate that an increase of GILZ expression in KC in obesity reduces LPS-induced liver inflammation.

### Decreased expression of the GR drives GILZ downregulation in Kupffer cells.

As obese mice are more sensitive to LPS, we tested whether obesity may also alter GILZ expression after LPS challenge. Twenty-four hours after LPS challenge, GILZ induction was observed in lean mice but not in obese mice (**Fig. 4.A**). As the GR controls GILZ at the transcriptional level [18], we quantified GR expression specifically in KC and

observed that GR mRNA level was decreased in obese mice compared to KC from controls (**Fig. 4.A**).

Figure 4



**Figure 4. GR expression in Kupffer cells regulates GILZ expression in the liver.** (A) GR expression in KC from control (white box) and ob/ob (black box) mice. GILZ expression in KC isolated from the livers of control (white boxes) and ob/ob (black boxes) mice stimulated with or without DEX or LPS (n=3-4). (B) mRNA expression of the 11 $\beta$ -HSD1 in KC from control (white box) and ob/ob (black box) mice. (C) Effects of GR inhibition on GILZ expression level after DEX or LPS stimulation in lean mice (n=4-10). (D) GILZ, CCL-2 and IL-6 expression in livers from lean (white boxes) and obese (black boxes) GR<sup>loxMCre</sup> and GR<sup>lox</sup> mice (n=5-8). \* p<0.05

Consequently, we tested the ability of DEX to stimulate GILZ expression in the liver of obese mice. We treated obese mice and their lean controls with DEX and recovered KC four hours later. GILZ induction was weaker in KC from obese mice than in controls (**Fig. 4.A**). The intracellular bioactive availability of GCs is controlled by the 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 $\beta$ -HSD1). We therefore quantified mRNA expression of 11 $\beta$ -HSD1 in KC and showed an increased expression in KC of HFD-mice compared to their lean controls (**Fig. 4.B**).

As GILZ induction was impaired in KC we took advantage of the GR antagonist RU486 to test whether the weak GR expression was responsible for the impairment of LPS-induced and DEX-induced GILZ stimulation. Treatment with the GR antagonist abolished GILZ induction by DEX and LPS in KC (**Fig. 4.C**). To clearly assess the

Robert O. et al

consequences of GR deficiency specifically in macrophages (including KC) on *GILZ* and liver cytokine expression, we used *GR<sup>LysMCre</sup>* mice. *GILZ* expression level was low in the liver of these mice whatever the given diet (HFD or control) (**Fig. 4.D**). HFD-fed *GR<sup>LysMCre</sup>* mice had a higher expression level of *CCL-2* and *IL-6* in the liver than HFD-fed controls (**Fig. 4.D**).

Overall, these results demonstrate the key role of GR downregulation in KC in the control of *GILZ* expression, induction and consequently on obesity-induced liver inflammation.

## DISCUSSION

Our findings show that *GR* and *GILZ* expression is abnormally low in KC of obese mice. The decreased expression of the *GR* in KC was responsible for the impairment of *GILZ* expression and induction. Overexpression of *GILZ* in KC decreased HFD-induced insulin resistance and rendered the liver of obese *GILZ*-Tg mice tolerant to LPS, by decreasing expression of proinflammatory cytokines and chemokines and by decreasing infiltration of lymphocytes into the liver. Oppositely, invalidation of *GR* expression in macrophages was associated with liver inflammation. Thus, the *GR*-*GILZ* axis in KC is an important contributor to the pathophysiology of liver inflammation in obese mice.

In obese patients, cortisol production and metabolic clearance are both increased. Therefore there is no significant modification of circulating levels [19-21]. Local tissue exposure rather than blood levels, reflects cortisol action [22-24]. Glucocorticoid (GC) display strong anti-inflammatory properties, *via* activation of the GR [25]. Contradictory results have been obtained about local cortisone conversion to cortisol in the liver. It has been suggested that hepatic activity of 11 $\beta$ -HSD1 was reduced in obesity, leading to a decrease production of local cortisol [26]. However, this reduction was not maintained in type 2 diabetes [27]. We have shown a decrease of 11 $\beta$ -HSD1 expression in KC of obese mice. 11 $\beta$ -HSD1 reduces cortisone to the active hormone cortisol that activates glucocorticoid receptors. 11 $\beta$ -HSD1 amplifies GR activation by converting cortisone to cortisol. 11 $\beta$ -HSD1 is highly regulated, within a physiological network of inflammatory and metabolic signaling, and contributes

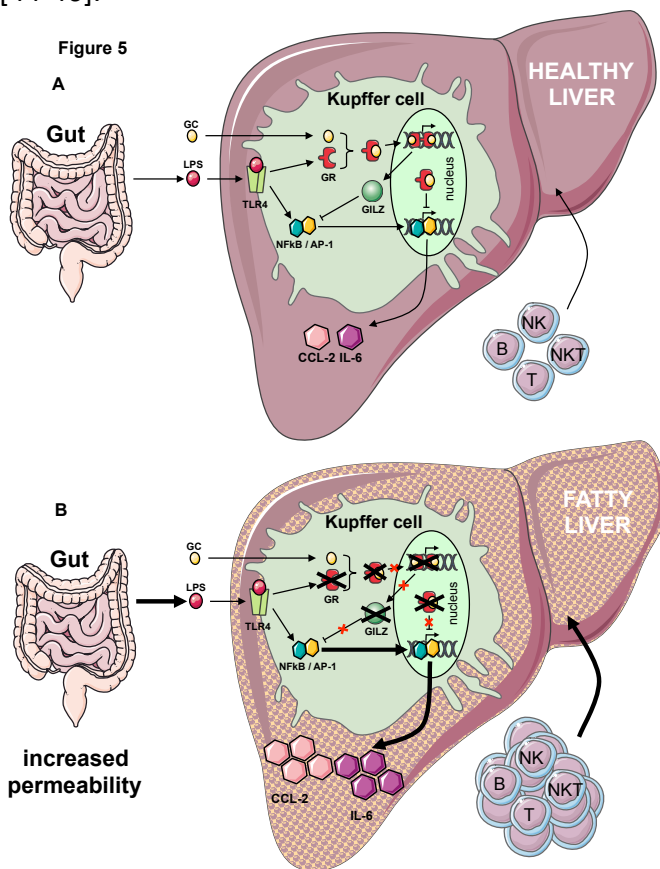
substantially to cortisol production in humans [24]. Therefore, our results suggest that the decrease of *GR* and *GILZ* may be related to a negative feedback loop, involving a decreased of 11 $\beta$ -HSD1 and orienting the liver towards a pro-inflammatory process.

Transcriptional regulation of *GILZ* by GC involves interaction between the GR and glucocorticoid-response element (GRE) sequences [16, 18, 28], six GRE being present in the promoter of the *GILZ* gene [18]. GR is known to repress NF- $\kappa$ B and AP-1 [29, 30]. Moreover, in several cells types, *GILZ* was shown to prevent activation of NF- $\kappa$ B [10, 11, 31-33] and AP-1 pathways [12]. Conversely, it has been shown recently that *GILZ* deficient macrophages lose their tolerance to LPS [34]. Thus, both *GR* and *GILZ* expression can lead to decreased secretion of proinflammatory cytokines and chemokines.

In septic shock, GR dimerization in macrophages was shown to be critical for survival [14]. Moreover, *GILZ* is involved in several inflammatory diseases including inflammatory colitis [35], alcoholic liver disease [10], rheumatoid arthritis [36], vascular inflammation [37] and more generally immune tolerance [38]. The liver acts as a bivalent immune organ, developing an inflammatory response against pathogens and a tolerant response to non-pathogen digestive bacterial compounds [39]. We demonstrate herein that impairment of *GILZ* expression and induction in KC from obese mice is directly linked to the decreased expression of *GR* in KC. Such a decrease of *GR* expression has already been described in the whole liver of *ob/ob* mice but has not been specifically studied in KC [40]. Interestingly, we observed an impairment of *GILZ* induction not only after DEX administration but also after LPS challenge. Restoration of *GILZ* expression prevents the liver inflammatory process. Interestingly, *GILZ* overexpression was associated with a decreased number of CD11b<sup>+</sup> expressing KCs which are the main source of pro-inflammatory cytokines and play an important role in the liver NKT activation [41-43]. Moreover, the percentage of bone marrow macrophages expressing CD11b<sup>+</sup>, which are involved in the renewal of tissue-resident macrophages [41-43], was also decreased, possibly due to their participation in the improvement of inflammation. Of note, CD11b<sup>+</sup> inflammatory

Robert O. et al

Kupffer cells/macrophages in the liver are recruited from bone marrow and may be different from resident Kupffer cells derived from yolk sac [44-46].



**Figure 5. Model for loss of liver tolerance to LPS by GR and GILZ downregulation.** (A) In normal condition, LPS activates inflammatory pathways (NF- $\kappa$ B / AP-1) via TLR-4. LPS also induces GR expression in KC. GC binds to the GR which interacts with GRE sequences and induces GILZ expression. Together, GR and GILZ inhibit the activation of pro-inflammatory pathways. This leads to a physiological secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines. (B) In obesity, downregulation of GR expression impairs GILZ induction by GC and LPS. GR decreased expression and the resulting weak expression of GILZ are insufficient to inhibit the activation of pro-inflammatory pathways. This leads to an increased secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines promoting recruitment of inflammatory cells into the liver.

GC bind to the GR leading to the induction of GILZ expression. We have shown that LPS-mediated GILZ induction also requires the GR. As observed for intestinal immunity, LPS may stimulate GILZ expression by inducing GC synthesis in a TNF- $\alpha$ - and macrophage-dependent manner [47]. Moreover, it has been shown that LPS can induce GR expression in mouse macrophages to mediate suppression of endotoxicity [48], and an increased expression of GR in mice leads to resistance to LPS-induced lethality [49]. Conversely, in mice with a conditional deletion of GR in macrophages, activation of TLR-4 by LPS causes increased cytokine secretion and mortality of peritoneal macrophages, thus demonstrating the pivotal role of GR in the anti-inflammatory process [50].

The relevance of our findings in the context of human disease is suggested by the inverse correlation between GILZ expression level and the severity of liver lesions (NAS). Overall, these results suggest that the GR-GILZ axis in KC represent a switch for inhibition/activation of obesity-induced liver inflammation. Therefore, a study targeting this pathway in human liver samples, especially in patients with an important inflammatory process, should be carried out before considering a clinical trial.

In obesity, adipocytes adapt to excess nutrients by hypertrophy and express inflammatory genes similar to macrophages [51]. LPS challenge of adipocytes leads to increased secretion of CCL-2 and IL-6, and direct or indirect interactions with other cell types including lymphocytes exacerbate these secretions [52]. Moreover, inflammation in white adipose tissue involves recruitment of lymphocytes before macrophage [53]. Interestingly, in *db/db* obese mice, GR expression in adipose tissue is not modified compared to lean littermates [54]. Overall, these observations may explain the discrepancy in GILZ expression level between the liver and white adipose.

In summary, our results demonstrate that the GR-GILZ axis in KC is an important target for the regulation of liver inflammation in obesity (**Fig. 5**). In lean mice, the GR-GILZ axis is functional and renders the liver tolerant to LPS by inhibiting pro-inflammatory pathways. However, in obesity, downregulation of GR-GILZ expression and induction allows a high secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines leading to the recruitment of inflammatory cells into the liver.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Joelle Taïeb (Hôpital Antoine Bécère, Service de Biochimie, Clamart, France) for technical assistance.

## REFERENCES

- [1] Perlemuter G, Bigorgne A, Cassard-Doulcier AM, Naveau S. Nonalcoholic fatty liver disease: from pathogenesis to patient care. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007;3:458-469.
- [2] Baffy G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. *J Hepatol* 2009;51:212-223.
- [3] Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, et al. Increased intestinal

Robert O. et al

permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2009;49:1877-1887.

[4] Leroux A, Ferrere G, Godie V, Cailleux F, Renoud ML, Gaudin F, et al. Toxic lipids stored by Kupffer cells correlates with their pro-inflammatory phenotype at an early stage of steatohepatitis. *J Hepatol* 2012;57:141-149.

[5] Wan YJ, Morimoto M, Thurman RG, Bojes HK, French SW. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gene is decreased in experimental alcoholic liver disease. *Life Sci* 1995;56:307-317.

[6] Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A, Vats D, Morel CR, Goforth MH, et al. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 2008;7:496-507.

[7] Bigorgne AE, Bouchet-Delbos L, Naveau S, Dagher I, Prevot S, Durand-Gasselino I, et al. Obesity-induced lymphocyte hyperresponsiveness to chemokines: a new mechanism of Fatty liver inflammation in obese mice. *Gastroenterology* 2008;134:1459-1469.

[8] D'Adamio F, Zollo O, Moraca R, Ayroldi E, Bruscoli S, Bartoli A, et al. A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity* 1997;7:803-812.

[9] Berrebi D, Bruscoli S, Cohen N, Foussat A, Migliorati G, Bouchet-Delbos L, et al. Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10. *Blood* 2003;101:729-738.

[10] Hamdi H, Bigorgne A, Naveau S, Balian A, Bouchet-Delbos L, Cassard-Doulcier AM, et al. Glucocorticoid-induced leucine zipper: A key protein in the sensitization of monocytes to lipopolysaccharide in alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2007;46:1986-1992.

[11] Ayroldi E, Migliorati G, Bruscoli S, Marchetti C, Zollo O, Cannarile L, et al. Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB. *Blood* 2001;98:743-753.

[12] Mittelstadt PR, Ashwell JD. Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. *J Biol Chem* 2001;276:29603-29610.

[13] Gough PJ, Gordon S, Greaves DR. The use of human CD68 transcriptional regulatory sequences to direct high-level expression of class A scavenger receptor in macrophages in vitro and in vivo. *Immunology* 2001;103:351-361.

[14] Kleiman A, Hubner S, Rodriguez Parkitna JM, Neumann A, Hofer S, Weigand MA, et al. Glucocorticoid receptor dimerization is required for survival in septic shock via suppression of interleukin-1 in macrophages. *Faseb J* 2012;26:722-729.

[15] Martinerie L, Viengchareun S, Delezoide AL, Jaubert F, Sinico M, Prevot S, et al. Low renal mineralocorticoid receptor expression at birth contributes to partial aldosterone resistance in neonates. *Endocrinology* 2009;150:4414-4424.

[16] Asselin-Labat ML, David M, Biola-Vidamment A, Lecoeuche D, Zennaro MC, Bertoglio J, et al. GILZ, a new

target for the transcription factor FoxO3, protects T lymphocytes from interleukin-2 withdrawal-induced apoptosis. *Blood* 2004;104:215-223.

[17] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313-1321.

[18] Wang JC, Derynck MK, Nonaka DF, Khodabakhsh DB, Haqq C, Yamamoto KR. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) scanning identifies primary glucocorticoid receptor target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:15603-15608.

[19] Strain GW, Zumoff B, Strain JJ, Levin J, Fukushima DK. Cortisol production in obesity. *Metabolism* 1980;29:980-985.

[20] Lottenberg SA, Giannella-Neto D, Derendorf H, Rocha M, Bosco A, Carvalho SV, et al. Effect of fat distribution on the pharmacokinetics of cortisol in obesity. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1998;36:501-505.

[21] Stewart PM. Tissue-specific Cushing's syndrome uncovers a new target in treating the metabolic syndrome--11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Clin Med* 2005;5:142-146.

[22] Stewart PM, Corrie JE, Shackleton CH, Edwards CR. Syndrome of apparent mineralocorticoid excess. A defect in the cortisol-cortisone shuttle. *J Clin Invest* 1988;82:340-349.

[23] Edwards CR, Stewart PM, Burt D, Brett L, McIntyre MA, Sutanto WS, et al. Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet* 1988;2:986-989.

[24] Stomby A, Andrew R, Walker BR, Olsson T. Tissue-specific dysregulation of cortisol regeneration by 11betaHSD1 in obesity: has it promised too much? *Diabetologia* 2014;57:1100-1110.

[25] Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *New Engl J Med* 2005;353:1711-1723.

[26] Stewart PM, Boulton A, Kumar S, Clark PM, Shackleton CH. Cortisol metabolism in human obesity: impaired cortisone-->cortisol conversion in subjects with central adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1022-1027.

[27] Valsamakis G, Anwar A, Tomlinson JW, Shackleton CH, McTernan PG, Chetty R, et al. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in lean and obese males with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4755-4761.

[28] Asselin-Labat ML, Biola-Vidamment A, Kerbrat S, Lombes M, Bertoglio J, Pallardy M. FoxO3 mediates antagonistic effects of glucocorticoids and interleukin-2 on glucocorticoid-induced leucine zipper expression. *Mol Endocrinol* 2005;19:1752-1764.

[29] Rao NA, McCalman MT, Moulos P, Francoijs KJ, Chatziioannou A, Kolis FN, et al. Coactivation of GR and NFkB alters the repertoire of their binding sites and target genes. *Gen Res* 2011;21:1404-1416.



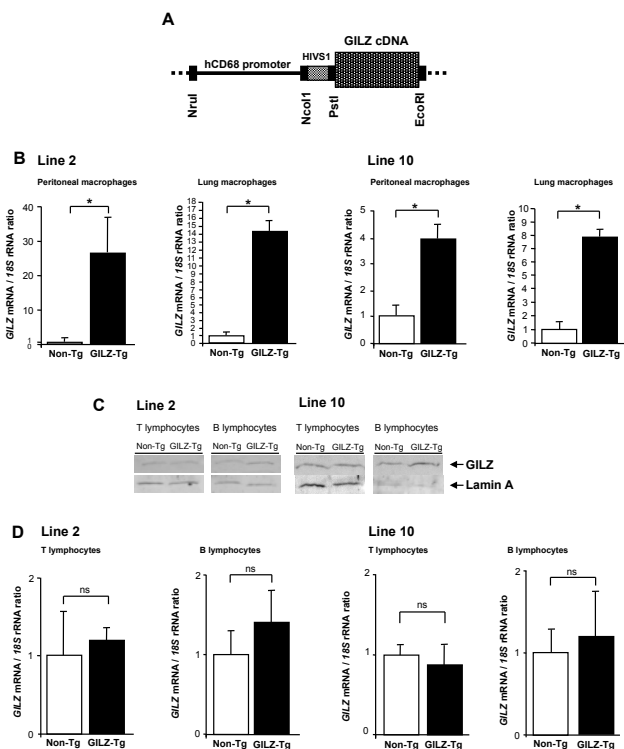
- [30] Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Gebel S, Ponta H, et al. Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 1990;62:1189-1204.
- [31] Eddleston J, Herschbach J, Wagelie-Steffen AL, Christiansen SC, Zuraw BL. The anti-inflammatory effect of glucocorticoids is mediated by glucocorticoid-induced leucine zipper in epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:115-122.
- [32] Yang YH, Aeberli D, Dacumos A, Xue JR, Morand EF. Annexin-1 regulates macrophage IL-6 and TNF via glucocorticoid-induced leucine zipper. *J Immunol* 2009;183:1435-1445.
- [33] Yang N, Zhang W, Shi XM. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) mediates glucocorticoid action and inhibits inflammatory cytokine-induced COX-2 expression. *J Cell Biochem* 2008;103:1760-1771.
- [34] Hoppstadter J, Kessler SM, Bruscoli S, Huwer H, Riccardi C, Kiemer AK. Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper: A Critical Factor in Macrophage Endotoxin Tolerance. *J Immunol* 2015;194:6057-6067.
- [35] Cannarile L, Cuzzocrea S, Santucci L, Agostini M, Mazzone E, Esposito E, et al. Glucocorticoid-induced leucine zipper is protective in Th1-mediated models of colitis. *Gastroenterology* 2009;136:530-541.
- [36] Beaulieu E, Ngo D, Santos L, Yang YH, Smith M, Jorgensen C, et al. Glucocorticoid-induced leucine zipper is an endogenous antiinflammatory mediator in arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:2651-2661.
- [37] Hahn RT, Hoppstadter J, Hachenthal N, Diesel B, Kessler SM, et al. Downregulation of the glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) promotes vascular inflammation. *Atherosclerosis* 2014;234:391-400.
- [38] Krzysiek R. Role of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) expression by dendritic cells in tolerance induction. *Transplant Proc* 2010;42:3331-3332.
- [39] Crispe IN, Giannandrea M, Klein I, John B, Sampson B, Wuensch S. Cellular and molecular mechanisms of liver tolerance. *Immunol Rev* 2006;213:101-118.
- [40] Tsai HJ, Romsos DR. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor-binding characteristics in obese (ob/ob) mice. *Am J Physiol* 1991;261:E495-499.
- [41] Kinoshita M, Uchida T, Sato A, Nakashima M, Nakashima H, Shono S, et al. Characterization of two F4/80-positive Kupffer cell subsets by their function and phenotype in mice. *J Hepatol* 2010;53:903-910.
- [42] Nakashima H, Ogawa Y, Shono S, Kinoshita M, Nakashima M, Sato A, et al. Activation of CD11b+ Kupffer cells/macrophages as a common cause for exacerbation of TNF/Fas-ligand-dependent hepatitis in hypercholesterolemic mice. *PLoS One* 2013;8:e49339.
- [43] Ikarashi M, Nakashima H, Kinoshita M, Sato A, Nakashima M, Miyazaki H, et al. Distinct development and functions of resident and recruited liver Kupffer cells/macrophages. *J Leukoc Biol* 2013;94:1325-1336.
- [44] Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 2015;518:547-551.
- [45] Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 2013;38:792-804.
- [46] Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 2012;336:86-90.
- [47] Noti M, Corazza N, Tuffin G, Schoonjans K, Brunner T. Lipopolysaccharide induces intestinal glucocorticoid synthesis in a TNFalpha-dependent manner. *Faseb J* 2010;24:1340-1346.
- [48] Salkowski CA, Vogel SN. Lipopolysaccharide increases glucocorticoid receptor expression in murine macrophages. A possible mechanism for glucocorticoid-mediated suppression of endotoxicity. *J Immunol* 1992;149:4041-4047.
- [49] Dejager L, Pinheiro I, Puimege L, Fan YD, Gremeaux L, Vankelecom H, et al. Increased glucocorticoid receptor expression and activity mediate the LPS resistance of SPRET/Ei mice. *J Biol Chem* 2010;285:31073-31086.
- [50] Bhattacharyya S, Brown DE, Brewer JA, Vogt SK, Muglia LJ. Macrophage glucocorticoid receptors regulate Toll-like receptor 4-mediated inflammatory responses by selective inhibition of p38 MAP kinase. *Blood* 2007;109:4313-4319.
- [51] Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology* 2012;142:711-725 e716.
- [52] Nitta CF, Orlando RA. Crosstalk between immune cells and adipocytes requires both paracrine factors and cell contact to modify cytokine secretion. *PloS one* 2013;8:e77306.
- [53] Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, et al. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vascular Biol* 2008;28:1304-1310.
- [54] Hirata A, Maeda N, Nakatsuji H, Hiuge-Shimizu A, Okada T, Funahashi T, et al. Contribution of glucocorticoid-mineralocorticoid receptor pathway on the obesity-related adipocyte dysfunction. *Biochem Biophys Res Com* 2012;419:182-187.

# SUPPLEMENTAL SECTIONS

## SUPPLEMENTAL RESULTS

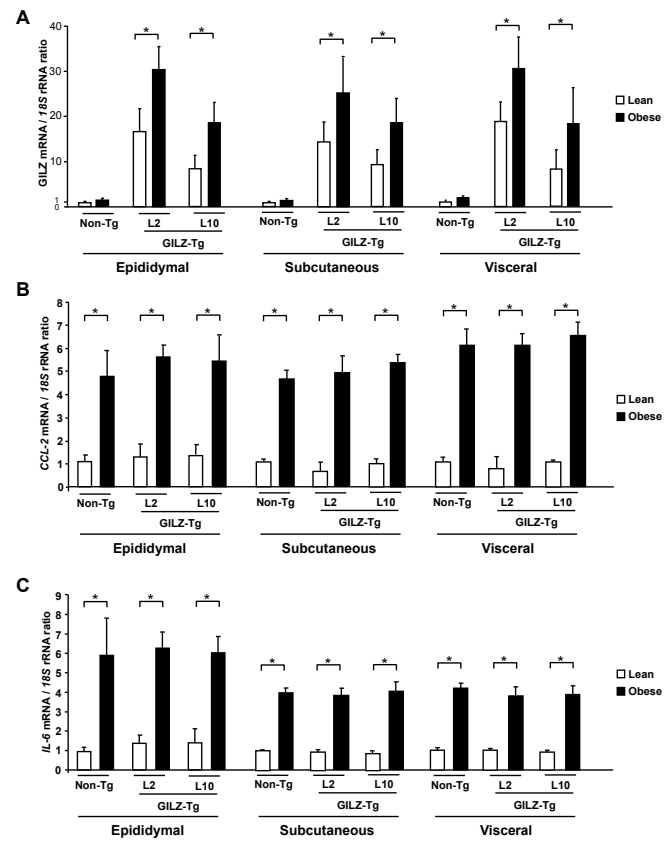
### Characterisation of GILZ-Tg mice

The expression of GILZ in peritoneal and lung macrophages in GILZ-Tg mice (**Supplemental Fig. S1.B**) was higher than that in non-Tg mice. To assess the specificity of *GILZ* overexpression in the monocyte/macrophage lineage, we quantified *GILZ* expression in T and B lymphocytes isolated from the spleen. There was no difference of *GILZ* expression between lymphocytes from GILZ-Tg and non-Tg mice (**Supplemental Fig. S1.C, and S1.D**).



**Supplemental Figure S1. Specificity of GILZ overexpression in GILZ-Tg mice.** (A) Schematic representation of the construct injected into fertilized mouse embryos. (B) *GILZ* mRNA expression in peritoneal and lung macrophages from GILZ-Tg (black boxes; line 2 and line 10) and non-Tg mice (white boxes). (C) *GILZ* protein expression in T and B lymphocytes isolated from the spleen of GILZ-Tg mice of line 2 and line 10. (D) *GILZ* mRNA expression in T and B lymphocytes isolated from spleen of GILZ-Tg (black boxes; line 2 and line 10) and non-Tg mice (white boxes) (n=5). \* p<0.05

In obesity *GILZ* expression was neither modified in perigonadal, nor subcutaneous nor visceral white adipose tissues. However, *GILZ* expression was further increased in white adipose tissues of GILZ-Tg mice after a HFD (**Supplemental Fig. S2.A**).

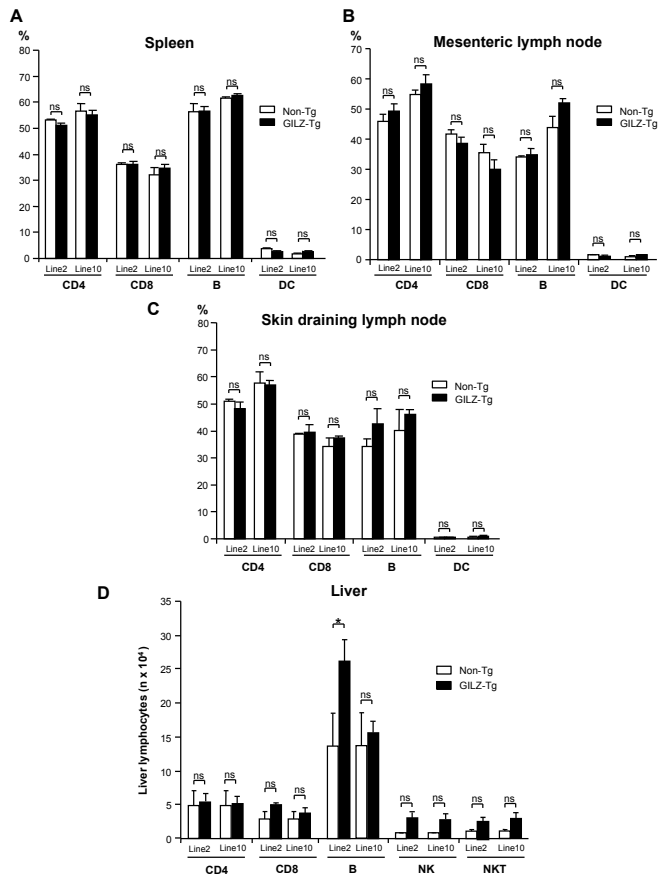


**Supplemental Figure S2. *GILZ* expression is not altered in white adipose tissue in obesity and *GILZ* overexpression in macrophages has no effect on white adipose tissue expression of *CCL-2* and *IL-6*.** (A) *GILZ*, (B) *CCL-2* and (C) *IL-6* expression in the livers of lean (white boxes) and obese (black boxes) GILZ-Tg (line2 and line 10) and non-Tg mice in epididymal, subcutaneous and mesenteric adipose tissues (n=5-8). \* p<0.05

We investigated whether the overexpression of *GILZ* in macrophages may decrease inflammation in white adipose tissues in obesity. Therefore we assessed inflammation in white adipose tissues from GILZ-Tg and non-Tg mice fed a HFD or a control diet. *CCL-2* (**Supplemental Fig. S2.B**) and *IL-6* (**Supplemental Fig. S2.C**) expressions were neither decreased in perigonadal, nor subcutaneous, nor mesenteric adipose tissues. These results demonstrate that *GILZ* overexpression in macrophages was sufficient to decrease inflammation in the liver but not in white adipose tissue.

We also verified that the high level of *GILZ* expression did not affect the composition of the lymphocyte subsets and dendritic cells in the spleen, mesenteric and skin-draining lymph nodes (**Supplemental Fig. S3.A, S3.B, and S3.C**). Lymphocyte subsets were similar in GILZ-Tg and non-Tg mice (except for B lymphocytes only in line 2 GILZ-Tg mice). However, only the number of B

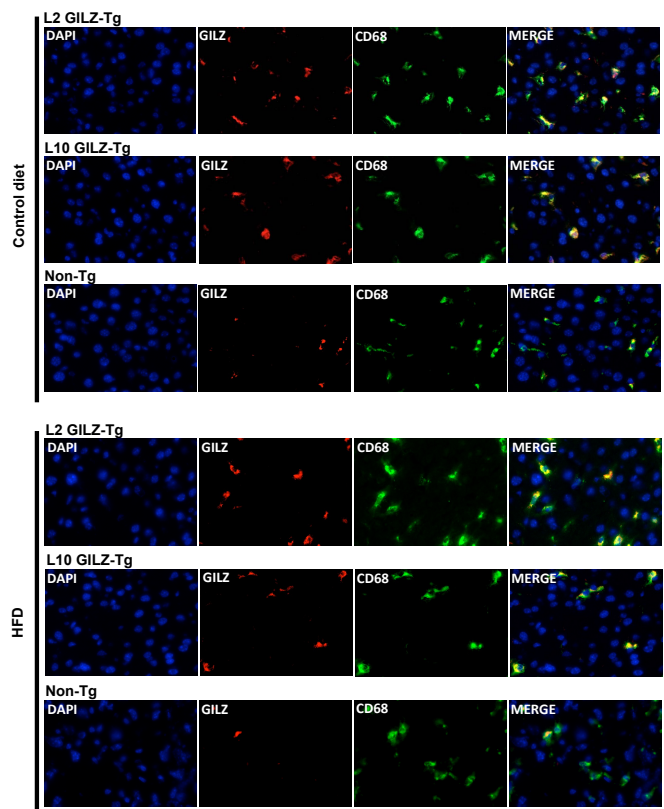
lymphocytes was higher in the liver of line 2 GILZ-Tg mice than non-Tg mice (Supplemental Fig. S3.D).



**Supplemental Figure S3. Composition of lymphocyte subsets and dendritic cells in the spleen, mesenteric lymph nodes, skin-draining lymph nodes and livers of GILZ-Tg mice.** The composition of lymphocyte subsets and dendritic cells does not differ (except for B cells in the liver of line 2 GILZ-Tg mice) between GILZ-Tg (black boxes ; line 2 and line 10) and non-Tg mice (white boxes) in (A) spleen, (B) mesenteric lymph nodes, (C) skin draining lymph nodes, and (D) liver (n=3-6). CD4 and CD8 percentages referred to the CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> subset. \* p<0.05; ns, not statistically significant.

We checked by immunohistofluorescence GILZ expression in KC in GILZ-Tg and non-Tg mice (Supplemental Fig. S4.) fed a HFD or a control

diet.



**Supplemental Figure S4. GILZ expression in KC by immunofluorescence.** Representative fields of liver sections from GILZ-Tg mice and littermate mice fed with control diet (upper panels) or with HFD (lower panels). Nuclei were visualized by immunofluorescence with DAPI staining (DAPI panels, blue). GILZ and CD68 expression were visualized by anti-GILZ (GILZ panels, red) and anti-CD68 (CD68 panels, green) Abs. Colocalization is visualized in merge panels (double positive cells in yellow) (magnification x1200).

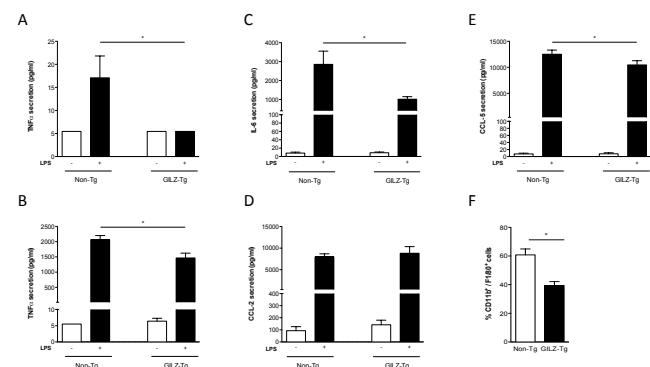
Characteristics of GILZ-Tg mice fed HFD are summarized in Supplemental Table 1.

**Supplemental Table 1.** Characteristics of GILZ transgenic (GILZ-Tg) and control littermate (non-Tg) mice after a 16-week HFD.

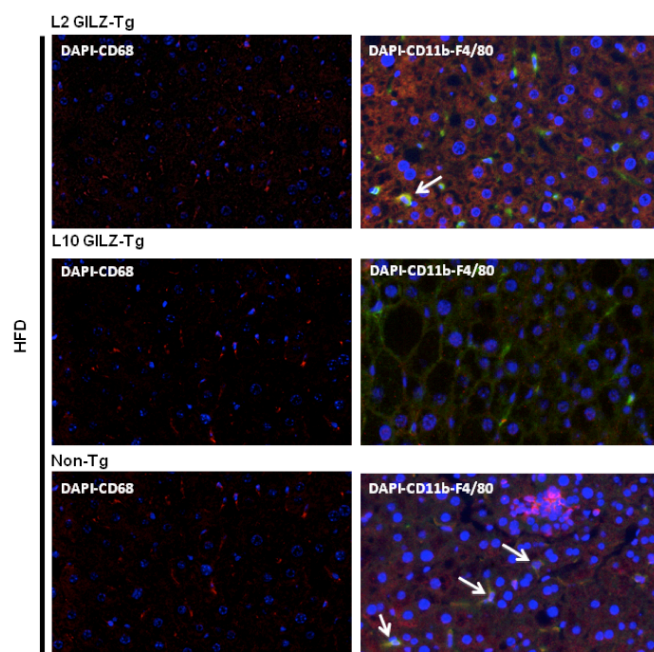
	non-Tg – HFD	GILZ-Tg – HFD	
		Line 2	Line 10
Mouse weight (g)	51.1 ± 1.0	51.1 ± 0.8	50.2 ± 0.7
Liver weight (g)	1.77 ± 0.05	2.05 ± 0.27	1.80 ± 0.04
Liver / body weight ratio x 100	3.47 ± 0.03	4.00 ± 0.49	3.59 ± 0.09
Serum ALT (IU/L)	98.7 ± 18.1	101.3 ± 23.6	94.0 ± 25.9

HFD, high fat diet. No differences were found (Kruskal-Wallis *post-hoc* ANOVA Fisher's PLSD test).

## OTHER SUPPLEMENTAL FIGURES



**Supplemental Figure S5. GILZ overexpression decreases proinflammatory cytokines/chemokines secretion after LPS stimulation.** (A) TNF $\alpha$  secretion in LPS-stimulated KC in GILZ-Tg mice and littermate mice. TNF $\alpha$  (B), IL-6 (C), CCL-2 (D) and CCL-5 (E) secretion before (white boxes) and after (black boxes) stimulation with LPS of BMDM from Non-Tg and GILZ-Tg mice. (F) Percentage of F4/80-CD11b<sup>+</sup> in isolated marrow cells in Non-Tg and GILZ-Tg mice. \* p < 0.05



**Supplemental Figure S6. CD11b expression in KC by immunofluorescence.** Representative fields of liver sections from GILZ-Tg mice and littermate mice fed with HFD. Nuclei were visualized by immunofluorescence with DAPI staining (blue). F4/80, CD11b and CD68 expression were visualized by anti-F4/80 (green), anti-CD11b (red) and anti-CD68 (CD68 panels, red) (magnification x630). Colocalization of CD11b and F4/80 is shown in merge panels (double positive cells in yellow shown by an arrow).

## SUPPLEMENTAL REFERENCES

[1] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313-1321.

[2] Cohen N, Mouly E, Hamdi H, Maillot MC, Pallardy M, Godot V, et al. GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response. *Blood* 2006;107:2037-2044.

## SUPPLEMENTAL MATERIALS AND METHODS

### Quantification of GILZ gene expression in the liver of patients

Twenty-five consecutive liver biopsies from obese patients were included. Patients gave informed consent and this study was approved by the INSERM Institutional Review Board (IRB). To be included, the patients had to be hospitalized in the hepatogastroenterology department of Antoine Bécélère Hospital, Clamart, France, for suspicion of NAFLD or in the department of surgery of the European Georges Pompidou hospital, Paris, France, for bariatric surgery. The inclusion criteria were abnormal transaminase levels or steatosis at ultrasonography and one feature of the metabolic syndrome: elevated fasting plasma glucose:  $\geq 100$  mg/dL (5.6 mmol/L), or previously diagnosed type 2 diabetes; raised blood pressure (BP): systolic BP  $\geq 130$  or diastolic BP  $\geq 85$  mm Hg, or treatment of previously diagnosed hypertension; reduced HDL cholesterol:  $< 40$  mg/dL (1.0 mmol/L) in men and  $< 50$  mg/dL (1.3 mmol/L) in women, or specific treatment for this lipid abnormality; elevated triglyceride levels:  $\geq 150$  mg/dL (1.7 mmol/L), or specific treatment for this lipid abnormality; waist circumference  $\geq 94$  cm for men and  $\geq 80$  cm for women. Exclusion criteria were average daily alcohol consumption of higher than 30 g (pure ethanol)/day for men and 20 g/day for women and/or history of excessive drinking, and concomitant liver disease: negative testing for hepatitis B surface antigen (HBsAg) and hepatitis C virus (HCV) antibodies, no evidence of drug-induced liver injury, negative testing for antinuclear, anti-smooth muscle actin, anti-liver-kidney microsome, and anti-mitochondrial antibodies, no serum iron transferrin saturation level  $> 45\%$ , normal ceruloplasmin and  $\alpha 1$ -antitrypsin serum levels. Patients underwent a transcutaneous or peroperative liver biopsy. One sample was used for histological assessment. When possible, another sample, weighing five to ten mg, was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use for RNA extraction. The staining procedure included hematoxylin-eosin-saffron, Masson's trichrome and picrosirius stains. All biopsy samples were evaluated independently by a single pathologist who was blind to



the clinical and biological data for the patients. The scoring system published by Kleiner was used [1].

For quantification of GILZ expression level, liver was homogenized in QIAzol lysis buffer (Qiagen, Hilden, Germany) with a Polytron. Total RNA was extracted using the RNeasy Lipid kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The DNase step was performed using an RNase-free DNase kit (Qiagen, Hilden, Germany) to eliminate residual DNA. The amount of RNA was determined from the optical density measured at 260 nm with a spectrophotometer. RNA was amplified using the Message Amp II aRNA kit (Ambion, Austin, TX, USA). Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used to reverse transcribe 5 µg RNA with random hexamers (Roche). Amplification was performed for the *GILZ* gene and results were normalized to the values for  $\beta$ -actin mRNA (expressed as *GILZ* mRNA (AU) /  $10^3$   $\beta$ -actin (AU)), as described previously [2].

**Purification of spleen lymphocytes and peritoneal and lung macrophages** T cells and B cells from spleens of GILZ-Tg and non-Tg mice were purified using a FACS Aria I cell sorter (BD Biosciences, San Jose, CA).

Peritoneal and lung macrophages were purified from the peritoneal cavity and lung homogenates of GILZ-Tg and non-Tg mice by magnetic sorting, using anti-F4/80 biotin (clone BM-8, eBioscience, San Diego, CA) and anti-biotin beads (Miltenyi Biotech, Bergish Gladbach, Germany). RNA was extracted by using a RNeasy plus micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany). *GILZ* expression was determined by RT-PCR as described in the manuscript.

**Quantification and phenotyping of the spleen, mesenteric and skin-draining lymph nodes.** Lymphocytes and dendritic cells were isolated from the spleens, skin-draining lymph nodes and mesenteric lymph nodes of GILZ-Tg and non-Tg mice, by homogenizing in PBS and filtered through a 70µm pore-size nylon. Lymphocytes were stained with PE-conjugated rat anti-CD4 monoclonal Ab; FITC-conjugated rat anti-CD8 monoclonal Ab; APC-conjugated rat anti-CD19, mouse anti-NK1.1 monoclonal Abs; and PerCP-Cy5.5-conjugated hamster anti-CD3 monoclonal Ab (Pharmingen, San Diego, CA). Dendritic cells were stained with FITC-conjugated rat anti-CD11c; PE-conjugated anti-MHCII monoclonal Abs (Pharmingen, San Diego, CA); and APC-conjugated rat anti-CD86 (ebiosciences, San Diego, CA). Results were analyzed by 4-color flow cytometry, using a FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA).

**Immunohistofluorescence** Frozen liver tissues were cut in 4µm section. Slides were fixed for 5 min with paraformaldehyde (PFA) 4% washed twice with PBS and blocked for 30 min in a solution of 5% bovine serum albumin in PBS for 30 min. Slides were first incubated with a polyclonal rabbit anti-GILZ (1/200, sc-26518, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) overnight at 4°C, washed twice with PBS, and incubated with secondary Ab, anti-rabbit/AlexaFluor 594 (1/200, A11072, Invitrogen, Carlsbad, CA). Then, slides were washed twice with PBS and incubated with a monoclonal rat anti-mouse CD68/FITC (1/200, MCA1957F, AbD Serotec, Dusseldorf, Germany) 1h at room temperature, washed twice with PBS, and incubated with secondary Ab, anti-FITC/AlexaFluor 488 (1/200, A11096, Invitrogen). For CD11b labelling, slides were incubated with a Rat monoclonal Anti-CD11b antibody (1/200, ab8878, abcam) 1h at room temperature, washed with PBS, and incubated with secondary Ab, anti-mouse/AlexaFluor 594 (1/200, A11020, Invitrogen, Carlsbad, CA).

Mounting was done using Vectashield medium (Vector Laboratories, Peterborough, UK). Images were acquired on a Zeiss microscope (Axio Imager 2) using the AxioVision software (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Original magnification x400

**TNFα secretion by macrophages** BMDM were obtained from bone marrow cells from GILZ-Tg (L2) and non-Tg littermate mice. The cells were washed with serum-free RPMI 1640 medium and the resultant bone marrow cells were incubated at  $10^6$  cells/mL in RPMI 1640 medium supplemented with 15% L-CSF, 10% SVF, 2% penicillin/streptomycin. KC were isolated and cultured as mentioned in the manuscript. BMDM and KC were incubated in their respective medium with or without LPS at 1 µg/mL. TNFα secretion was determined by using ELISA Quantikine® kits (R&D systems Europe, Lille, France) after 24h hours of stimulation.

**Quantification of CD11b<sup>+</sup> bone marrow-derived macrophages** Bone marrow cells sorted from the marrow were washed in PBS 2% FCS then resuspended at  $10^6$  cells / 100µl. Bone marrow cells were stained with FITC-conjugated rat anti-CD11b (Pharmingen, San Diego, CA) and APC-conjugated rat anti-F4/80 (AbD Serotec, UK). After permeabilization by leucoperm (AbD Serotec, UK) cells were stained with PE-conjugated anti-CD68 (AbD Serotec, UK). Results were analyzed by using a FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA).

### III. Annexe 3

#### **Intestinal microbiota shapes alcohol-induced liver inflammation and injury**

*Marta Llopis<sup>1,2,3</sup>, Laura Bosch<sup>2,3</sup>, Aurélia Bruneau<sup>2,3</sup>, **Gladys Ferrere<sup>1,4,5</sup>**,  
Frédéric Cailleux<sup>1,4,5</sup>, Tiphaine Le Roy<sup>2,3</sup>, Sylvie Rabot<sup>2,3</sup>, Françoise Gaudin<sup>1,4,5</sup>,  
Dominique Berrebi<sup>1,5,6</sup>, Sylvie Naveau<sup>1,4,7</sup>, Philippe Gérard<sup>2,3</sup>, Gabriel  
Perlemuter<sup>1,4,5,7</sup> Anne-Marie Cassard<sup>1,4,5</sup>*  
*En préparation*



Nos travaux montrent que le MI joue un rôle essentiel dans la MAF. Le but de ce travail était de comparer la sévérité des lésions hépatiques induites par l'alcool chez des souris axéniques et des souris conventionnelles.

Les souris conventionnelles et axéniques ont été soumises à notre modèle d'alcoolisation (Lieber DeCarli) pendant 6 semaines. L'alcool induit des modifications du microbiote fécal qui ont été évaluées chez les souris conventionnelles. Des analyses ont été faites sur la perméabilité intestinale, la stéatose, l'inflammation et les sous-ensembles lymphocytes intra-hépatiques dans les deux groupes de souris.

L'alcoolisation de souris conventionnelles a confirmé que l'exposition à l'alcool modifie le microbiote intestinal. L'augmentation de la perméabilité intestinale a été associée à la stéatose et l'inflammation avec des modifications des sous-ensembles des lymphocytes intra-hépatiques. De façon intéressante, les souris axéniques alcoolisées ont montré une diminution des différents paramètres testés d'environ 20 % comparées à leurs homologues conventionnels. En outre, les modifications des sous-ensembles de lymphocytes ont suggéré que les souris axéniques développaient des signes de réponse immunitaire active dans le foie par rapport à des souris conventionnelles.

Ces résultats confirment que la consommation chronique d'éthanol induit une dysbiose dramatique chez la souris. En outre, nous démontrons que le MI est activement impliqué dans la diminution de la perméabilité intestinale et des lésions hépatiques après la consommation chronique d'alcool par un mécanisme qui pourrait impliquer la production d'éthanol. L'idée de corriger la dysbiose intestinale et par conséquent, de réparer les méfaits de celle-ci peut représenter une nouvelle stratégie thérapeutique dans le traitement de la MAF.

***Dans ce travail, j'ai participé aux expériences pour le reviewing du papier qui consistaient en l'extraction d'ARN du foie pour quantifier en RT-qPCR de nouvelles cibles du métabolisme de l'alcool.***



# Intestinal microbiota shapes alcohol-induced liver inflammation and injury

Marta Llopis<sup>1,2,3</sup>, Laura Bosch<sup>2,3</sup>, Aurélie Bruneau<sup>2,3</sup>, Gladys Ferrere<sup>1,4,5</sup>, Frédéric Cailleux<sup>1,4,5</sup>,  
Tiphaine Le Roy<sup>2,3</sup>, Sylvie Rabot<sup>2,3</sup>, Françoise Gaudin<sup>1,4,5</sup>, Dominique Berrebi<sup>1,5,6</sup>, Sylvie Naveau<sup>1,4,7</sup>,  
Philippe Gérard<sup>2,3</sup>, Gabriel Perlemuter<sup>1,4,5,7</sup>, Anne-Marie Cassard<sup>1,4,5</sup>

<sup>1</sup>INSERM U996, DHU Hepatinov, Clamart, France.

<sup>2</sup>INRA, UMR1319 Micalis, Jouy-en-Josas, France.

<sup>3</sup>AgroParisTech, UMR Micalis, Jouy-en-Josas, France.

<sup>4</sup>Université Paris-Sud, Faculté de médecine Paris-Sud, Kremlin-Bicêtre, France

<sup>5</sup>Institut Paris-Sud d'Innovation Thérapeutique (IPSIT), IFR141, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France.

<sup>6</sup>AP-HP, Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Hôpital Robert Debré, Paris, France.

<sup>7</sup>AP-HP, Hepatogastroenterology and Nutrition, Hôpital Antoine-Béclère, Clamart, France.

**Background and Aims:** Recent evidences suggest that the gut microbiota plays an essential role in alcoholic liver disease. The aim of our study was to compare the severity of alcohol induced liver lesions in germ free and conventional mice.

**Methods:** Conventional and germ-free mice were submitted to a Lieber DeCarli diet with or without chronic alcohol exposure for 6 weeks. Alcohol induced modifications of fecal microbiota were assessed in conventional mice. Indicators of intestinal permeability, liver steatosis, inflammation and intrahepatic lymphocytes subsets were recovered in all groups of mice.

**Results:** Alcoholization of conventional mice confirmed that alcohol exposure modified gut microbiota. The increase of intestinal permeability was associated with steatosis and inflammation with modifications of intrahepatic lymphocytes subsets. Interestingly, alcoholized germ-free mice showed that for the most parameters tested, the values of germ-free mice were about 20% lower than those observed in their conventional counterparts. Moreover, the lymphocyte subset modifications suggested that germ-free mice developed signs of active immune response in the liver as compared to conventional mice harboring strongly

decreased and qualitatively different population of intrahepatic lymphocytes.

**Conclusion:** The present study confirmed that chronic ethanol intake induces a dramatic dysbiosis in mice. Moreover, we demonstrate that the intestinal microbiota is actively involved in intestinal permeability impairment and in liver injury after chronic alcohol consumption by a mechanism that might implicate the production of ethanol. Balancing the deregulated intestinal microbial ecosystem by selective decreasing specific species of bacteria may represents a new therapeutic strategy in the treatment of alcoholic liver disease.

**Keywords:** Alcohol; microbiota; dysbiosis; germ free mice

*In preparation*

\*Corresponding authors :

adress : INSERM UMR\_S996 32, rue des Carnets, 92140 Clamart, France.

E-mail : cassard.doulcier@u-psud.fr (Dr. CASSARD)

**Abbreviations.** ALD: Alcohol liver diseases, IM: Intestinal microbiota, PAMP: Pathogen-associated molecular pattern, TLR-4 : Toll-like receptor 4, GF: Germ Free, LDC/ Lieber DeCarli, Alc: Alcoholized, Ctrl: control, ALT: Alanine amino transferase, , TG: Triglycerides, FISH: Fluorescent in Situ Hybridization. ( order of appearance)

## INTRODUCTION

Alcoholic liver disease (ALD) remains an important cause of morbidity and mortality in western countries [1]. ALD can be divided into three overlapping phases with distinct pathological and clinical features: fatty liver (or steatosis), which is reversible but predisposes to more severe liver injury and alcoholic hepatitis with different stages of liver inflammation and severity, and finally fibrosis/cirrhosis. Significant progress has been made in understanding mechanisms contributing to the ALD pathology [2]. However, there are no clear evidence that could explain why among patients with chronic alcohol consumption, only some of them will develop liver disease. Therefore, other factors than the amount of alcohol intake play a role in the onset and progression of the liver inflammatory process. Recent evidences support the notion that intestinal microbiota (IM) plays an important role in alcohol-induced liver disease. A correlation between endotoxemia level and severity of alcoholic liver disease has been reported [3-5]. Alcohol intake induces important changes in the gut microbiota, such as small and large intestinal bacterial overgrowth [6], changes the bacterial composition of intestinal bacteria [7] and a dysbiosis-induced intestinal inflammation [8]. The intestinal epithelium acts as a barrier between contents of the intestinal lumen and the bloodstream. Additionally to its effects on intestinal microbiota, alcohol consumption in humans and animals promotes a concomitant disruption of the intestinal barrier enabling bacteria and their pattern-associated molecular patterns (PAMPs), to enter the portal and next systemic circulation [9]. Increased gut permeability and translocation of bacterial components, are associated with increased level of endotoxemia [10]. From

bloodstream, PAMPs are transported to the liver where they directly activate cellular receptors of the innate immunity such as Toll-like receptors (TLRs) family contributing to liver inflammatory responses following alcohol consumption [11-14].

These evidences support the notion of a direct link exists between IM, integrity of intestinal barrier and liver inflammation. Despite these evidences the precise role of intestinal dysbiosis in alcohol-induced liver inflammation remains to be defined. To better decipher the contribution of IM dysbiosis in the alcohol-induced liver damage, we used germ-free mice as a model. Chronic alcoholisation of conventional and germ-free mice and subsequent evaluation of alcoholic liver disease features allowed us to dissect the effect of gut microbiota from the effect of ethanol itself in the pathophysiology of alcoholic liver disease.

## MATERIALS AND METHODS

**Animal experimentation** Conventional mice: eight weeks old female mice C57BL/6J (Janvier laboratory, Le Genest, France) were pair matched and divided into two groups avoiding differences in gut microbiota profiles. Mice were housed in individual cages throughout the experiment in order to monitor daily food intake and maintained in temperature-controlled rooms in a 12-hour light-dark cycle. Animals were given ad libitum access to diet. Animal care was provided in accordance with National Institutes of Health guidelines.

Germ-free mice: 8-week old female germ free (GF) mice from the strain C57BL/6J born and raised in sterile isolators from GF breeding pairs at the GF facilities of ANAXEM (Micalis Institute, INRA Jouy en Josas, France) were used. Two GF isolators were used, each contained 16 mice housed in individual cages throughout the

experiment in order to monitor daily food intake. Animals were placed in temperature-controlled rooms in a 12-hour light-dark cycle. Animal care was provided in accordance with National Institutes of Health guidelines.

**Chronic exposure to ethanol** All mice were first allowed to adapt to a modified Lieberde-Carli (LDC) liquid diet (**Supplementary Table 1**) [15] by a gradual substitution of regular chow by the liquid control diet. LDC diet contained 1.0 Kcal/ml of which 35% were fat derived, 11% were carbohydrate derived and 18% were derived from protein. After the adaptation period (T1), a group of GF mice (GF-Alc) and conventional mice (Cv-Alc) were adapted to ethanol by administration of the increasing doses of EtOH 95% v/v (increasing concentration by 1% every two days) for a period of two weeks to reach a final concentration of 4,5% that lasted for 5 weeks (T5). The pair matched groups of GF mice (GF-Ctrl) and conventional mice (Cv-Ctrl) were pair-fed with LDC control diet and maltodextrine to maintain an isocaloric balance. Animals were euthanized after 5 weeks of alcohol treatment. During the LDC diet, animals did not have access to drinking water. Wood Gnawing Blocks, (Bio-Serv) were placed inside the cages to satisfy the need to chew and gnaw.

**Tissues and samples** Feces were collected before (T0) and after (T1) LDC control diet acclimatization and before euthanasia (T5) from conventional and GF mice. Urine was collected from conventional and GF mice one week before euthanasia. At euthanasia, mice were anesthetized and blood sample was collected from the retro-orbital sinus collected in EDTA containing tubes and was centrifuged at 4°C, 10000xG, 10 minutes to obtain plasma that was kept at -80°C until

analysis. Then, the livers were perfused inversely to the normal flux with PBS/EDTA (5 mM). After removing blood, livers were excised, weighed and either fixed in buffered formaldehyde for histological analysis, snap-frozen in liquid nitrogen for triglyceride extraction or prepared for the characterization of infiltrating inflammatory cells. Epididymal fat was dissected and weighted. All samples were stored at -80°C until use unless otherwise indicated.

**Alcohol in urine** Ethanol concentration in urine was measured by a colorimetric kit (EnzyChrom™ Ethanol Assay Kit, Medibena, Vienna, Austria) following the manufacturer's instructions.

**Intestinal permeability.** Intestinal permeability was determined by the detection of a 4000Da-fluorescent-dextran-FITC (Dx-FITC, Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, USA) in blood as described elsewhere [16]. Briefly, 500 mg/kg body-weight Dx-FITC was administered by gastric gavage to 5 h fasted mice were. 4h later, 100 uL of blood were collected from the jaw and centrifuged at 4°C, 12000xg for 3 min. Plasma was diluted in an equal volume of PBS (pH7.4) and the concentration of fluorescein was determined by spectrophotofluorometry with an excitation wavelength of 485nm and an emission wavelength of 535 nm. Standard curves were obtained by diluting Dx-FITC in non-treated plasma with PBS (1:2 v/v).

**Assessment of liver enzymes** Liver alanine aminotransferase (ALT) activity in serum was assayed by a spectrophotometric method (Olympus, AU400).

**Characterisation of inflammatory cells by flow cytometry** Intrahepatic lymphocytes were isolated by a 2-step perfusion



procedure. First, circulating cells were quantified and their phenotype examined as described [17]. Non parenchymateous cells were stained with the following antibodies: V500-conjugated rat anti-CD45 monoclonal Ab, PE-conjugated hamster anti-CD3 monoclonal Ab; FITC-conjugated rat anti-CD8b2 monoclonal Ab; APC-conjugated mouse anti-NK1.1 monoclonal Ab; and V450-conjugated rat anti-CD4 monoclonal Ab (Pharmingen, San Diego, California). Acquisition of data was performed with a Fortessa LSR-II machine (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, New Jersey) and analysis using a FlowJo software package (XXXX).

**Liver triglycerides** Portions of frozen liver from mice were homogenized in chloroform-methanol (2 :1) in order to extract total lipids and triglycerides (TGs) were separated by thin layer chromatography. TGs were extracted from the silica plate with acetone, measured with a colorimetric diagnostic kit (Triglycerides FS; Diasys) and expressed in mg of triglycerides per milligram of liver.

**Liver histology** Liver was fixed overnight in 4% paraformaldehyde and then embedded in paraffin. Paraffin sections (4- $\mu$ m) were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E). Liver steatosis was assessed semi-quantitatively in five grades: none = 0; mild = 1 (1% to 5% of hepatocytes); moderate = 2 (6% to 32%); marked = 3 (33% to 66%); and severe = 4 (67% to 100%).

**Analysis of the gut microbiota** Microbiota composition at different time points was assessed by Fluorescent in Situ Hybridization combined with Flow Cytometry (FISH-FCM). We used this technique because it has been recently shown that it matches well with results from phylogenetic Microbiota Array [18]

when known bacteria are targeted. We therefore targeted 9 specific bacterial groups representing major known intestinal bacterial groups. Fecal samples were collected from mice at different time points and fixed as previously described [19]. Fecal samples were collected before LDC diet (T0), after the LDC adaptation period (T1) and after 5 weeks of LDC diet with alcohol or maltodextrine (T5). A set of 12 probes targeting bacterial 16S rRNA were used to quantify the relative proportion of intestinal bacteria (**Supplementary Table 2**). Fluorescent in situ hybridization combined with flow cytometry was performed as described previously [20].

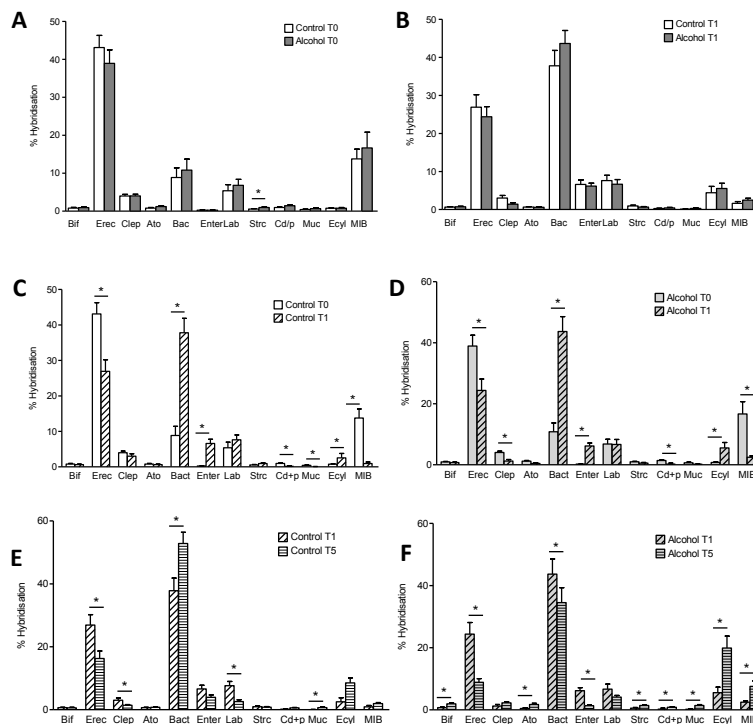
**Statistical analyses.** Results are represented as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis were performed by Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests (Graphpad Prism, Graphpad Software Inc, La Jolla, California, USA) ;  $p < 0,05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### Alcohol consumption induces dysbiosis

Conventional mice were divided into two groups to constitute control (Cv-Ctrl) non alcoholized group and alcohol (Cv-Alc) alcoholized group as . Because each individual has its own microbiota and responds differently to external stimuli including diet, we analyzed gut microbiota composition before diet introduction (T0). Based on gut microbiota composition, we splitted mice into the two groups in order to minimize differences in the composition of the main intestinal bacterial taxa. Only *Streptococcus*, was statistically different between the two groups of mice before diet introduction (**Fig. 1A**).

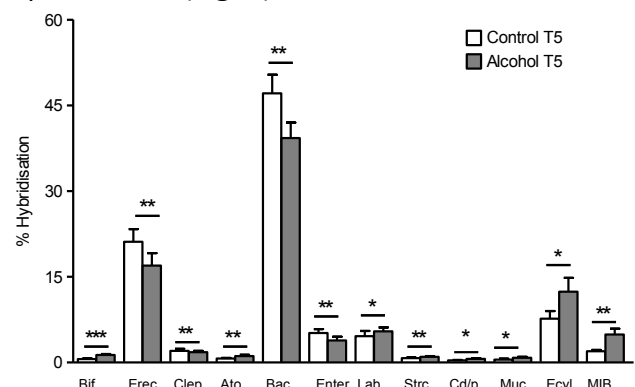
**Figure 1**



**Figure 1 - Evolution of gut microbiota before and after control and alcohol Lieber DeCarli diet.** (A) Microbiota profile of the two groups of mice, control at the starting of the experiment (T0) and after one week of Lieber DeCarli adaptation (B). (C, D) Comparison of microbiota profile of both control group and alcohol group before and after the lipid enriched diet adaptation. (E, F) Comparison of microbiota profile of both control group and alcohol group after alcohol diet. t test, \*p<0.05.

We next measured gut microbiota composition after LDC acclimatization (T1). As expected, introduction of the corn oil enriched LDC diet induced profound changes in gut microbiota profiles. Those changes were similar for the two groups of mice (Fig. 1B). Of note, we observed a decrease of *Clostridium* groups including *Clostridium coccoides*, *Clostridium leptum*, and *Clostridium difficile* as well as *Mouse intestinal bacteria* groups. Conversely an increase of *Bacteroides*, *Enterobacteria* and *Erysipelotrichi* (Fig. 1C and D). Five weeks of LDC control diet induced some modifications of bacteria species without major changes compared to those previously described in murine models of obesity except for the group of Bacteroidetes (Fig. 1E) [20]. On the other side, gut microbiota composition in alcohol treated mice after a 5-week alcoholisation period revealed significant changes in most of the analysed bacterial groups (Fig. 1F) indicating that alcohol intake induces important changes in gut microbial ecosystem confirming previously reported data (245). These changes included an

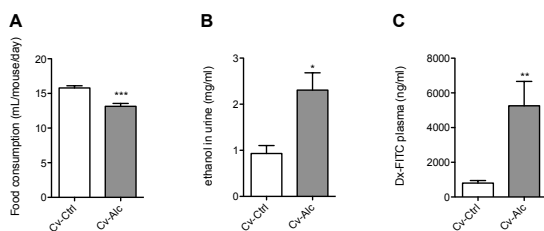
increase of *Bifidobacterium*, *Atopobium*, *Streptococcus*, *Clostridium difficile/perfringens*, *Akkermansia muciniphila*, *Erysipelotrichi* and *Mouse intestinal bacteria* groups. Conversely we found a decrease of *Clostridium coccoides*, *Bacteroides* and *Enterobacteria* groups (Fig. 1F). Therefore, at the end of the study fecal microbiota profiles were significantly different between control and alcohol exposed mice (Fig. 2).



**Figure 2 – Dysbiosis induced by the alcoholization.** Microbiota profile after alcoholization compared with the gut microbiota of the control group. t test, \*p<0.05.

A decrease of the food consumption was observed in alcoholized mice compared

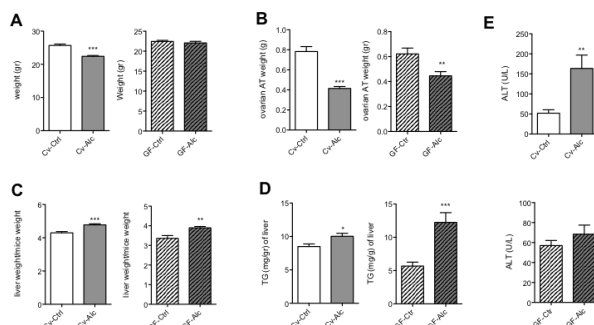
to the control group (**Fig. 3A**). The alcohol consumption in alcohol-treated mice was  $13.6 \pm 0.44$  g alcohol/kg and induced an efficient alcoholization as shown by the ethanol urine concentration (**Fig. 3B**). We also confirmed that alcohol consumption induced an increase of the intestinal permeability as shown by the high detection of orally-inoculated Dx-FITC in plasma (**Fig. 3C**) in alcohol treated mice.



**Figure 3 - Food consumption and increase of intestinal permeability.** (A) Food consumption. (B) Ethanol in urine , metabolic cage for 24h. (C) Intestinal permeability measured by plasmatic Dextran FITC after 4H of an oral gavage.

### Alcohol induced dysbiosis is associated with liver lesions

Since alcohol modulates the gut microbiota, and dysbiosis was associated to an increase of intestinal permeability, we assessed the development of liver lesions in alcohol exposed mice. Alcohol intake induced a decrease of mice weight (**Fig.4A**), which may be explained by the lower diet intake (**Fig. 3A**) and decreased amount of adipose tissue (**Fig. 4B**).



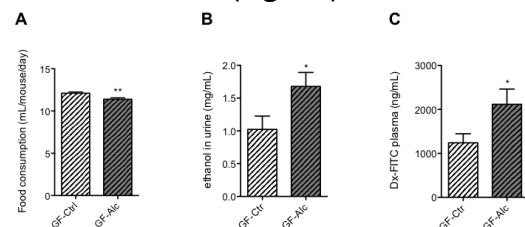
**Figure 4 - Alcohol induces hepatic lesions.** (A) weight mice, (B) ovarian adipose tissue weight, (C) liver weight/mice weight, (D) Triglycerides quantification and steatosis scoring of liver histology, (E) representative photography of liver histology, left panel: control group, right panel: alcohol group and semi quantification of necroinflammation, (F) plasmatic ALT.

The liver to body weight ratio was increased in mice fed alcohol and was not associated

with hepatomegaly (**Fig. 4C**). Mice on alcohol diet showed greater steatosis than mice on control diet as shown by the higher triglyceride content in hepatocytes and histological examination (**Fig. 4D and E**). Histological evaluation of the liver sections showed a significant difference in inflammation score between two groups (**Fig. 4E**) with significantly higher level of plasmatic transaminases in mice fed a alcohol diet (**Fig. 4F**).

### Alcohol induces hepatic lesions in the absence of gut microbiota.

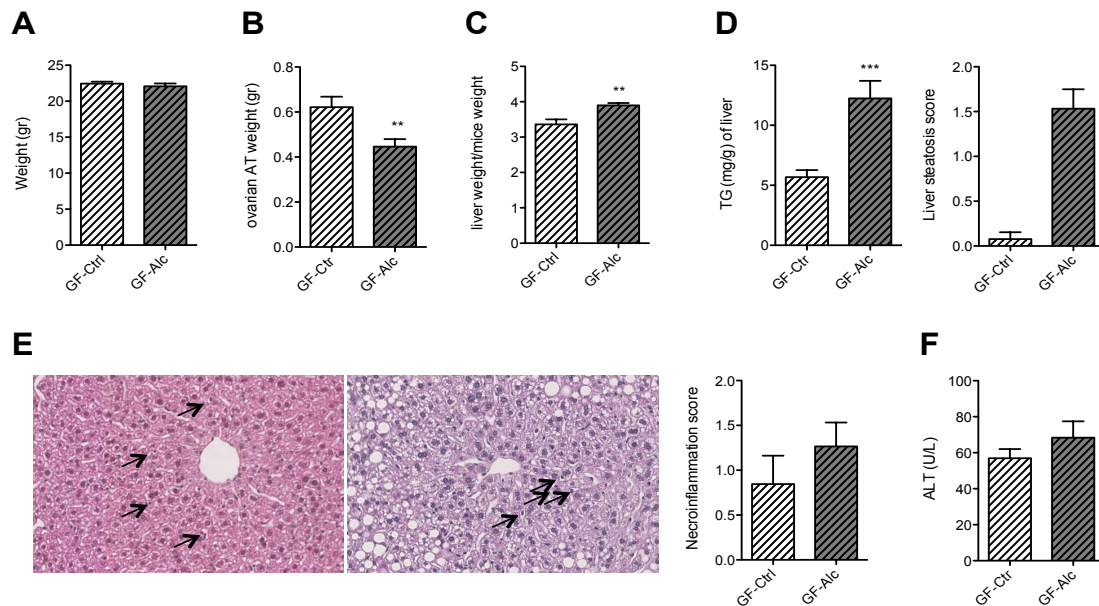
To assess the extent to which the gut microbiota profile was implicated in the observed alcohol-related liver lesions, we reproduced the alcoholization experiments in GF mice. For most of the measured parameters, we detected lower values in GF mice as compared to their conventional counterparts. Diet consumption by GF mice was lower than that of conventional mice (**Fig. 5A**) and GF mice under alcohol diet drank significantly less diet than GF mice under control diet (**Fig. 5A**).



**Figure 5 - Alcohol induces a disruption of the gut epithelial barrier in germ free mice.** (A) Percentage of alcohol consumption. (B). Urine ethanol , metabolic cage for 24h. (C) Intestinal permeability measured by plasmatic Dextran FITC after 4H of an oral gavage.

Mean alcohol consumption of GF mice was  $12.6 \pm 0.11$  g alcohol/kg, and not significantly differed from that of conventional alcoholized mice ( $13.1 \pm 0.24$  g alcohol/kg) . However, GF mice under alcohol diet had significantly lower urine ethanol concentration than their conventional counterparts ( $1.53 \pm 0.18$  mg/mL vs.  $2.33 \pm 0.34$  mg/mL,  $p = 0.05$ ). As expected, there were no significant differences in ethanol concentration in urine

between conventional and GF control groups (**Fig. 5B**).



**Figure 6 - Alcohol induces hepatic lesions in germ free mice.** (A) weight mice, (B) ovarian adipose tissue weight, (C) liver weight/mice weight, (D) Triglycerides quantification and steatosis scoring of liver histology, (E) representative photography of liver histology analysis, left panel ; control germ free group , right panel, alcohol germ free group and semi quantification of necroinflammation, (F) plasmatic ALT.

Intestinal permeability was significantly higher in GF mice under alcohol diet than in control GF mice (**Fig. 5C**), and Conversely to conventional mice, alcohol consumption by GF mice did not induce significant changes in body weight (**Fig. 6A**). weight in GF mice under alcohol diet (**Fig. 6B**). F

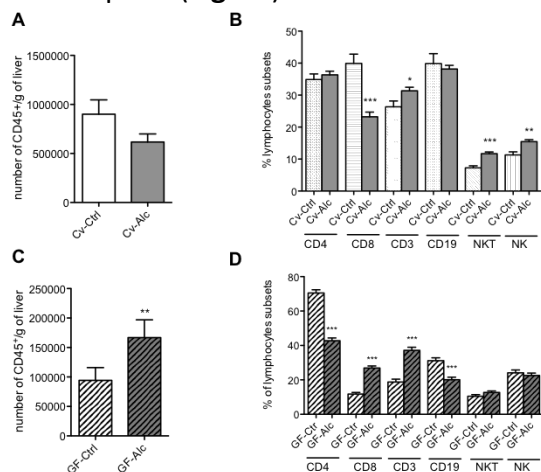
As shown for the conventional mice, alcohol intake induced an increase of the liver to body weight ratio (**Fig. 6C**) with both parameters being lower than in the conventional groups of mice. Triglyceride content in the livers in GF mice under control diet was lower than that in their conventional counterparts. In contrast, alcohol diet provoked a significant increase in liver triglyceride content (**Fig. 6D**). Assessment of GF mice liver status by histological scoring revealed a slightly higher necroinflammation score in GF mice under alcohol treatment compared to control GF mice, and the same tendency was found for liver transaminases (**Fig. 6E and F**). To quantify liver lymphocyte infiltration, CD45<sup>+</sup> lymphocytes and intrahepatic lymphocyte

again values were significantly lower than those of their conventional counterparts ( $2115 \pm 348$  vs.  $5257 \pm 1408$ ,  $p=0.05$ ). However, we detected a significant decrease of adipose tissue

subsets were analyzed by flow cytometry in conventional and GF mice (**Fig. 7**). In conventional mice, no differences between total numbers of CD45<sup>+</sup> lymphocytes between alcohol exposed and non exposed mice was found (**Fig. 7A**).

However, alcohol exposure was associated with modifications within intrahepatic lymphocytes subsets. We showed that cytotoxic CD8<sup>+</sup> T lymphocytes were decreased in Cv-Alc mice as compared to Cv-Ctrl mice. Conversely, percentages of CD3<sup>+</sup> T lymphocytes, NKT lymphocytes and NK lymphocytes were increased in Cv-Alc mice as compared to Cv-Ctrl mice (**Fig. 7B**). In contrast to conventional mice, alcohol intake in GF mice provoked a significant increase in the total pool of CD45<sup>+</sup> intrahepatic lymphocytes (**Fig. 7C**). Moreover,

we found striking differences in subsets distribution between alcohol-exposed conventional and GF mice. As shown (**Fig. 7D**), GF mice subjected to alcohol diet had a greater percentage of CD3<sup>+</sup> lymphocytes as their conventional counterparts probably mostly due to increased pool of CD8<sup>+</sup> T cells (**Fig. 7D**). In contrast, alcohol exposure induced decrease in CD4<sup>+</sup> T helper cells number in GF mice but not in conventional mice. In contrast to alcohol-exposed conventional mice, the pool of NKT lymphocytes and NK cells was not significantly modified in alcoholized GF mice. Finally, we found a decreased pool of CD19<sup>+</sup> B lymphocytes in GF mice under alcohol diet but not in alcohol-exposed conventional mice. These data strongly suggest that the unique hepatic immune system is strongly controlled by intestinal microbiota. The cellular characterization of liver lymphocytes revealed that germ free mice subjected to alcohol diet had a greater percentage of CD3<sup>+</sup> lymphocytes as their conventional counterparts (**Fig.7D**).



**Figure 7 - Intrahepatic lymphocyte subsets after alcoholization of mice.** Number of CD45<sup>+</sup> counted by gram of liver in conventional mice (A) and germ free mice (C). Percentage of lymphocytes subsets after alcoholization in conventional mice (B) and germ free mice (D).

However, they had a lower percentage of CD4<sup>+</sup> T helper lymphocytes and a high level of CD8<sup>+</sup> cytotoxic lymphocytes. NKT lymphocytes and NK cells were not modified in alcoholized GF mice conversely to what we observed in conventional mice. There

was also a marked reduction of CD19<sup>+</sup> B lymphocytes in GF mice under alcohol diet compared to control GF mice.

## DISCUSSION

The gut ecosystem is composed of 100 trillion bacteria, 1-2 kg in mass inhabiting the gastrointestinal tract. It is a highly diverse ecosystem comprised of over 2,000 distinct species and has a collective genome of 150- fold more genes than those of the eukaryotic human [21]. This system has also a great metabolic potential that can be compared to that of an organ [22]. Most of these bacteria cannot be grown by conventional culture techniques and thus much of the study of intestinal microbial ecosystem consists of identifying bacterial species and their genes (microbiome) by DNA sequencing. Recent studies have evidenced great impact of IM on host's health status and has been associated with many disorders such as inflammatory bowel diseases, diabetes, obesity, mental disorders and alcoholic liver disease [23].

In this study, we provide evidence for the role of gut microbiota in alcohol induced liver lesions. Although the relationship between alcohol and intestinal microbiota has been recently addressed, the specific contribution of gut microbiota to the susceptibility of alcohol-induced liver disease has not been fully defined. Recent data reinforced the importance of gut microbiota in alcohol-induced liver disease by using conventionalized GF mice subjected to an acute alcohol consumption in water [24]. However, data concerning the role of IM and chronic alcohol intake by using germ-free mice are lacking.

The addition of polyunsaturated oil to alcohol intake diet facilitates the progression of the liver injury in rodents [25] and has largely been described as an efficient rodent model of alcoholization [15]. We first used this model for chronic alcohol consumption in conventional mice and

analysed the impact on gut microbiota. Introduction of diet induced a similar decrease of *Clostridium* and MIB species and a similar increase in *Bacteroides*, *Enterobacteria* and *Erysipelotrichi* in both groups as previously reported in several studies [20, 26, 27]. However, we found that alcohol intake provoked changes in all detected microbial groups demonstrating that alcohol intake dramatically changes gut microbial composition as demonstrated in recent reports [7, 28]. Ethanol intake has been largely related to an increase of intestinal permeability both in humans and in animal models [29]. We confirmed that alcohol consumption induced an increase of the intestinal permeability. Our model is also characterized by alcohol-induced liver lesions classically observed with alcohol consumption as a marked steatosis and an increase of liver transaminases. Lymphocytes subsets distribution was modified by alcohol intake with higher intrahepatic CD3 T cell, NKT and NK cell percentages induced by alcohol exposure. These results altogether indicate, as previously suggested that alcohol intake induces profound changes in gut microbiota composition, an increase in gut permeability and gradual liver damage.

However, to better dissect the implication of gut microbiota in intestinal barrier defects and liver impairment after chronic ethanol intake we subjected GF mice to the same protocol as used for conventional mice. GF mice represent adequate model for exploring the complex interplay existing between the host's physiology, intestinal microbiota and liver immune system homeostasis [30].

Interestingly, we found that for most of the measured parameters, the values in GF mice were about 20% lower as compared to their conventional counterparts with the exception of intestinal permeability. Intestinal permeability of GF mice under control diet was nearly twice bigger as that

of conventional mice under the same diet. It has been previously demonstrated that intestinal barrier of GF mice is defective as these mice lack maturation of immune system by commensal bacteria at birth and therefore they also lack the mechanisms by which intestinal permeability is preserved. While intestinal permeability in GF mice was increased under alcohol diet but in significant lesser extent as compared to their conventional counterparts. These data strongly support the notion that the gut microbiota increase intestinal permeability under chronic alcohol intake.

Germ free mice are known to be leaner than their conventional counterparts and the TG content in the liver is correlated to this lower weight. However, we observed a higher TG accumulation in the liver of alcoholized GF mice. TG storage is one of the earliest pathological changes in the progression of ALD, and aldehydes participate in the pathogenesis through modulating hepatic lipid metabolism and lipid homeostasis, especially by increasing lipolysis and fatty acid release from adipose tissue. The absence of microbiota which is able to metabolize a part of alcohol in acetaldehyde could explain this large increase in alcoholized mice [31, 32].

Direct ethanol toxicity on enterocytes and its relationship with increased intestinal permeability has been previously suggested but this is the first in vivo demonstration of direct effect of ethanol on gut permeability in the absence of gut microbiota. Interestingly, food consumption of GF mice was lower than food consumption of their conventional counterparts possibly due to their lower energetic requirements [33] evidencing that gut microbiota metabolism has a direct impact on host's total energetic expenses. Of note, the alcohol intake as measured by grams of alcohol per gram of body weight was not significantly different between the two groups of alcoholized mice. Also, while ethanoluria of conventional and

GF mice under control diet was identical, after chronic ethanol intake conventional mice had a 30% higher ethanol excretion in urine than its GF counterparts. The contribution of microbiota's ethanol production in liver diseases has been already evidenced by other groups demonstrating that the elevation of blood-ethanol concentration in obese murine model and NASH patients is due in part to an increased abundance of alcohol-producing bacteria [26, 34, 35]. This might be an explanation for the fact that in our experiment, despite chronic ethanol consumption, GF mice under ethanol diet did not show an increase of liver transaminases although this hypothesis needs further confirmation.

One explanation could be that gut microbiota metabolites may have some protective role on hepatocytes.

The characterization of lymphocyte subsets in the liver of conventional and GF mice revealed a dramatic differences existing between two groups. We found strongly decreased pool of total CD3<sup>+</sup> T cells mostly due to decreased CD8<sup>+</sup> T cells in GF mice as compared to conventional mice. Of note, while alcohol exposure markedly decreased CD8<sup>+</sup> T cells in conventional mice, the opposite was observed in GF mice. Alcohol exposure did not changed the distribution of CD4<sup>+</sup> T cells in conventional mice but significantly decreased it in GF mice. Also, we found an increase of NKT lymphocytes and NK cells percentages in alcohol-exposed conventional mice but not GF mice [36]. Finally, alcohol exposure induced decrease in intrahepatic pool of CD19<sup>+</sup> B cells in GF mice but not in conventional mice. Overall these strongly support the notion that intestinal microbiota shapes liver immune system and response to chronic alcohol exposure.

In summary, the present study evidences that chronic ethanol intake induces a dramatic dysbiosis in mice. We demonstrate that the intestinal microbiota is

actively involved in intestinal permeability impairment and in liver injury after chronic alcohol consumption by a mechanism that might also implicate the production of ethanol. We also demonstrate that intestinal microbiota directly control liver immune system. Our data suggest that targeting intestinal microbiota may represent a new therapeutic strategy in the treatment of alcohol-related liver diseases.

## Acknowledgments.

We thanks Roman Krzysiek for helpful discussions.

## REFERENCES

- 1 Teli MR, Day CP, Burt AD, et al. Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver. *Lancet* 1995;346:987-90.
- 2 Bajaj JS, Heuman DM, Hylemon PB, et al. Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. *J Hepatol* 2014;60:940-7.
- 3 Parlesak A, Schafer C, Schutz T, et al. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol* 2000;32:742-7.
- 4 Ferrier L, Berard F, Debrauwer L, et al. Impairment of the intestinal barrier by ethanol involves enteric microflora and mast cell activation in rodents. *Am J Pathol* 2006;168:1148-54.
- 5 Szabo G, Bala S, Petrasek J, et al. Gut-liver axis and sensing microbes. *Dig Dis* 2010;28:737-44.
- 6 Chen P, Torralba M, Tan J, et al. Supplementation of Saturated Long-Chain Fatty Acids Maintains Intestinal Eubiosis and Reduces Ethanol-induced Liver Injury in Mice. *Gastroenterology* 2015;148:203-14 e16.
- 7 Bode JC, Bode C, Heidelberg R, et al. Jejunal microflora in patients with chronic alcohol abuse. *Hepatogastroenterology* 1984;31:30-4.
- 8 Yan AW, Fouts DE, Brandl J, et al. Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology* 2011;53:96-105.
- 9 Leclercq S, Matamoros S, Cani PD, et al. Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:E4485-93.
- 10 Qin N, Yang F, Li A, et al. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature* 2014;513:59-64.
- 11 International Group. Alcoholic liver disease: morphological manifestations. *Lancet* 1981;1:707-11.
- 12 Naveau S, Cassard-Doulcier AM, Njike-Nakseu M, et al. Harmful effect of adipose tissue on liver lesions in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2010;52:895-902.
- 13 Devkota S, Wang Y, Musch MW, et al. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in IL10<sup>-/-</sup> mice. *Nature* 2012;487:104-8.

- 14 Wei B, Dalwadi H, Gordon LK, et al. Molecular cloning of a *Bacteroides caccae* TonB-linked outer membrane protein identified by an inflammatory bowel disease marker antibody. *Infect Immun* 2001;69:6044-54.
- 15 Carvalho FA, Koren O, Goodrich JK, et al. Transient inability to manage proteobacteria promotes chronic gut inflammation in TLR5-deficient mice. *Cell host & microbe* 2012;12:139-52.
- 16 Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16731-6.
- 17 Gerard P. Metabolism of cholesterol and bile acids by the gut microbiota. *Pathogens* 2014;3:14-24.
- 18 Poupon RE, Poupon R, Balkau B. Ursodiol for the long-term treatment of primary biliary cirrhosis. The UDCA-PBC Study Group. *N Engl J Med* 1994;330:1342-7.
- 19 Bertola A, Mathews S, Ki SH, et al. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). *Nat protoc* 2013;8:627-37.
- 20 Szabo G. Gut-liver axis in alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 2015;148:30-6.
- 21 Le Roy T, Llopis M, Lepage P, et al. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* 2013;62:1787-94.
- 22 Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 2013;341:1241214.
- 23 Tuovinen E, Keto J, Nikkila J, et al. Cytokine response of human mononuclear cells induced by intestinal *Clostridium* species. *Anaerobe* 2013;19:70-6.
- 24 Everard A, Belzer C, Geurts L, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:9066-71.
- 25 Shan M, Gentile M, Yeiser JR, et al. Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science* 2013;342:447-53.
- 26 Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, et al. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 2012;489:220-30.
- 27 Xie G, Zhong W, Li H, et al. Alteration of bile acid metabolism in the rat induced by chronic ethanol consumption. *FASEB J* 2013;27:3583-93.
- 28 Sipka S, Bruckner G. The immunomodulatory role of bile acids. *Int Arch Allergy Immunol* 2014;165:1-8.
- 29 Langhi C, Pedraz-Cuesta E, Haro D, et al. Regulation of human class I alcohol dehydrogenases by bile acids. *J Lipid Res* 2013;54:2475-84.
- 30 Paumgartner G, Beuers U. Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology* 2002;36:525-31.
- 31 Kakiyama G, Pandak WM, Gillevet PM, et al. Modulation of the fecal bile acid profile by gut microbiota in cirrhosis. *J Hepatol* 2013;58:949-55.
- 32 Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 2009;58:1091-103.



**Supplementary Table 1. Composition of the modified Lieber-DeCarli diet.**

<i>Ingredients</i>	<i>g/L</i>
Casein (100 Mesh)	41.4
L-Cysteine	0.5
DL-Methionine	0.3
Corn Oil	39.6
Maltose Dextrin	25.6
Cellulose	10.0
Salt Mix	8.75
Vitamin Mix	2.5
Choline Bitartrate	0.53
Xanthan Gum	3.0

Ethanol was added at the increasing concentrations as described in Material and Methods.

**Supplementary Table 2. Nomenclature, sequences and targets of probes used for fluorescent in situ hybridization.**

<i>Probe name</i>	<i>Sequence (5' ® 3')</i>	<i>Target</i>	<i>Fluorochrome</i>
EUB 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	domain Bacteria	5'FITC
EUB 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	domain Bacteria	5'CY5
NON EUB 338	ACATCCTACGGGAGGC	none	5'FITC
NON EUB 338	ACATCCTACGGGAGGC	none	5'CY5
Bif164	CATCCGGCATTACCACCC	<i>Bifidobacterium</i> genus	5'CY5
Bac303	CCAATGTGGGGGACCTT	<i>Parascardovia</i> genus	5'CY5
Lab158	GGTATTAGCAYCTGTTTCCA	<i>Bacteroides-Prevotella</i> group	5'CY5
	GTTTTRTCAACGGCAGTC	<i>Lactobacillus-Lactococcus-Enterococcus</i> group	5'CY5
	Competitor 1		
Clep 1156	GRTTTTRTCAYCGGCAGTC*	<i>Clostridium leptum</i> subgroup	5'CY5
	Competitor 2		
	GTVTTRTCBACGGCAGTC*		
Ato 291	GGTCGGTCTCTCAACCC	<i>Atopobium</i> cluster and <i>Coriobacterium</i> group	5'CY5
Enter 1432	CTTTTGCAACCCACT	Enterobacteria	5'CY5
Erec 482	GCTTCTTAGTCAGGTACCG	<i>Clostridium coccoides</i> group	5'CY5
Strc 493	GTTAGCCGTCCTTTCTGG	Streptococci and Lactococci	5'CY5
Cdif198+Cperf 191	TCCATCCTGTACTGGCTCACC	<i>Clostridium difficile</i> and <i>Clostridium perfringens</i>	5'CY5
Muc 1437	CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT	<i>Akkermansia muciniphila</i>	5'CY5
Ecy1 387	CGCGGCATTGCTCGTTCA	Erysipelotrichi	5'CY5
MIB 661	GCATTCCGCATACTTCTC	mouse intestinal Bacteria	5'CY5

\*Y = C/T, R = G/A, K = G/T, M = C/A, W = A/T, B = C/G/T and V = G/C/

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



1. Ginsberg HN. REVIEW: Efficacy and mechanisms of action of statins in the treatment of diabetic dyslipidemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:383-392.
2. Racanelli V, Rehmann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 2006;43:S54-62.
3. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168-1170.
4. Cassard-Doulcier A-M, and Perlemuter, G. . Inflammation hépatique liée à l'obésité (NASH). *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 2011;46:240-246.
5. Gao B, Jeong WI, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology* 2008;47:729-736.
6. Crispe IN. Immune tolerance in liver disease. *Hepatology* 2014;60:2109-2117.
7. Leifeld L, Trautwein C, Dumoulin FL, Manns MP, Sauerbruch T, Spengler U. Enhanced expression of CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), and CD40 and their ligands CD28 and CD154 in fulminant hepatic failure. *Am J Pathol* 1999;154:1711-1720.
8. Crispe IN. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003;3:51-62.
9. Lau AH, Thomson AW. Dendritic cells and immune regulation in the liver. *Gut* 2003;52:307-314.
10. Higashi N, Fujioka K, Denda-Nagai K, Hashimoto S, Nagai S, Sato T, Fujita Y, et al. The macrophage C-type lectin specific for galactose/N-acetylgalactosamine is an endocytic receptor expressed on monocyte-derived immature dendritic cells. *J Biol Chem* 2002;277:20686-20693.
11. Bamboat ZM, Stableford JA, Plitas G, Burt BM, Nguyen HM, Welles AP, Gonen M, et al. Human liver dendritic cells promote T cell hyporesponsiveness. *J Immunol* 2009;182:1901-1911.
12. Liaskou E, Wilson DV, Oo YH. Innate immune cells in liver inflammation. *Mediators Inflamm* 2012;2012:949157.
13. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 2010;11:889-896.
14. Akira S. TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;311:1-16.
15. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003;3:23-35.
16. Stein M, Keshav S. The versatility of macrophages. *Clin Exp Allergy* 1992;22:19-27.
17. Li D, Guabiraba R, Besnard AG, Komai-Koma M, Jabir MS, Zhang L, Graham GJ, et al. IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134:1422-1432.e1411.
18. Benoit M, Desnues B, Mege JL. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 2008;181:3733-3739.
19. Martinez FO, Gordon S. The evolution of our understanding of macrophages and translation of findings toward the clinic. *Expert Rev Clin Immunol* 2015;11:5-13.
20. Ramachandran P, Pellicoro A, Vernon MA, Boulter L, Aucott RL, Ali A, Hartland SN, et al. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012;109:E3186-3195.
21. Sica A, Invernizzi P, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology. *Hepatology* 2014;59:2034-2042.
22. Laskin DL, Laskin JD. Role of macrophages and inflammatory mediators in chemically induced toxicity. *Toxicology* 2001;160:111-118.

23. Filice GA. Antimicrobial properties of Kupffer cells. *Infect Immun* 1988;56:1430-1435.
24. Ruzittu M, Carla EC, Montinari MR, Maietta G, Dini L. Modulation of cell surface expression of liver carbohydrate receptors during in vivo induction of apoptosis with lead nitrate. *Cell Tissue Res* 1999;298:105-112.
25. Knolle P, Schlaak J, Uhrig A, Kempf P, Meyer zum Buschenfelde KH, Gerken G. Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepatol* 1995;22:226-229.
26. Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med* 1996;184:19-29.
27. Yu S, Nakafusa Y, Flye MW. Portal vein administration of donor cells promotes peripheral allospecific hyporesponsiveness and graft tolerance. *Surgery* 1994;116:229-234; discussion 234-225.
28. You Q, Cheng L, Kedl RM, Ju C. Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells. *Hepatology* 2008;48:978-990.
29. Xu L, Yin W, Sun R, Wei H, Tian Z. Kupffer cell-derived IL-10 plays a key role in maintaining humoral immune tolerance in hepatitis B virus-persistent mice. *Hepatology* 2014;59:443-452.
30. Park SW, Kang JW, Lee SM. Role of Kupffer cells in ischemic injury in alcoholic fatty liver. *J Surg Res* 2015;194:91-100.
31. Rosenthal E. LC, Salmon D. , Morlat P. , Bonnet F., Burty C., May T. , Costagliola D. , Jouglu E., Semaille h, G. Chêne C., Cacoub P. . Causes de décès par hépatopathie en France en 2005 des adultes infectés par le VIH: enquête Mortavic 2005 en collaboration avec Mortalité 2005, ANRS-EN19. *La revue de médecine interne* 2006; 27:314.
32. Wu F, Wang J, Pu C, Qiao L, Jiang C. Wilson's disease: a comprehensive review of the molecular mechanisms. *Int J Mol Sci* 2015;16:6419-6431.
33. Nagral A. Gaucher disease. *J Clin Exp Hepatol* 2014;4:37-50.
34. Luc G, Turpin G, De Gennes JL. [Physiopathology of primary hyperlipidemias]. *Ann Med Interne (Paris)* 1986;137:155-166.
35. Ichai P, Samuel D. [Liver transplantation for fulminant hepatitis]. *Gastroenterol Clin Biol* 2009;33:51-60.
36. Ichai P, Legeai C, Francoz C, Boudjema K, Boillot O, Ducerf C, Mathurin P, et al. Patients with acute liver failure listed for superurgent liver transplantation in France: reevaluation of the Clichy-Villejuif criteria. *Liver Transpl* 2015;21:512-523.
37. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;34:274-285.
38. Santé OMDI. Obésité et surpoids. Centre des médias de l'OMS 2015;Aide-mémoire N°311.
39. Benkimoun P. Une épidémie massive d'obésité menace l'Europe. *le journal le Monde* 2015.
40. Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité. INSERM / KANTAR HEALTH / ROCHE. ObEpi 2012.
41. Epidémiologie de l'obésité chez les personnes diabétiques de type 2 en France métropolitaine. Comité scientifique Entred. 2010.
42. Paul Poirier J-PDs. Obésité et maladies cardiovasculaires. *MEDECINE/SCIENCES* 2003;19 943-949.

43. Junquero D. RY. Syndrome métabolique : quelle définition pour quel(s) traitement(s) ? *MEDECINE/SCIENCES* 2005;21 1045-1053.
44. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology* 2012;142:1592-1609.
45. Kleiner DE, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathologic patterns and biopsy evaluation in clinical research. *Semin Liver Dis* 2012;32:3-13.
46. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24:289-293.
47. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973;60:646-649.
48. Cholongitas E, Papatheodoridis GV, Vangeli M, Terreni N, Patch D, Burroughs AK. Systematic review: The model for end-stage liver disease--should it replace Child-Pugh's classification for assessing prognosis in cirrhosis? *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22:1079-1089.
49. Vetelainen R, van Vliet A, Gouma DJ, van Gulik TM. Steatosis as a risk factor in liver surgery. *Ann Surg* 2007;245:20-30.
50. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001;50:1844-1850.
51. Guyot C, Lepreux S, Combe C, Doudnikoff E, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Desmouliere A. Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:135-151.
52. Abul Ala Syed Rifat Mannan MD. Liver and intrahepatic bile ducts-nontumor Hepatitis Chronic hepatitis - grading / staging. *Pathologies outlines .com* 2015.
53. Casanova-Martinez L, Castillo-Grau P, Jaquotot-Herranz M, Ruiz-Fernandez G, Han EJ, Tortajada-Laureiro L, Olveira-Sanz A, et al. Hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver. *Rev Esp Enferm Dig* 2012;104:505-506.
54. Nordenstedt H, White DL, El-Serag HB. The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2010;42 Suppl 3:S206-214.
55. Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 2001;33:464-470.
56. biomédecine Adl. Le rapport médical et scientifique du prélèvement et de la greffe en France. . 2014.
57. Paradis V, Zalinski S, Chelbi E, Guedj N, Degos F, Vilgrain V, Bedossa P, et al. Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: a pathological analysis. *Hepatology* 2009;49:851-859.
58. Day CP, James OF. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? *Hepatology* 1998;27:1463-1466.
59. Ferre P, Fougelle F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes Metab* 2010;12 Suppl 2:83-92.
60. Fong DG, Nehra V, Lindor KD, Buchman AL. Metabolic and nutritional considerations in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology* 2000;32:3-10.
61. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004;114:147-152.

62. Fromenty B. Drug-induced liver injury in obesity. *J Hepatol* 2013;58:824-826.
63. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Jr., Ory DS, Schaffer JE. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3077-3082.
64. Li YX, Han TT, Liu Y, Zheng S, Zhang Y, Liu W, Hu YM. Insulin resistance caused by lipotoxicity is related to oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in LPL gene knockout heterozygous mice. *Atherosclerosis* 2015;239:276-282.
65. Seyer P, Vallois D, Poitry-Yamate C, Schutz F, Metref S, Tarussio D, Maechler P, et al. Hepatic glucose sensing is required to preserve beta cell glucose competence. *J Clin Invest* 2013;123:1662-1676.
66. Woo SL, Xu H, Li H, Zhao Y, Hu X, Zhao J, Guo X, et al. Metformin ameliorates hepatic steatosis and inflammation without altering adipose phenotype in diet-induced obesity. *PLoS One* 2014;9:e91111.
67. Jo HK, Kim GW, Jeong KJ, Kim do Y, Chung SH. Eugenol ameliorates hepatic steatosis and fibrosis by down-regulating SREBP1 gene expression via AMPK-mTOR-p70S6K signaling pathway. *Biol Pharm Bull* 2014;37:1341-1351.
68. Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:7281-7286.
69. Benhamed F, Denechaud PD, Lemoine M, Robichon C, Moldes M, Bertrand-Michel J, Ratzin V, et al. The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J Clin Invest* 2012;122:2176-2194.
70. Cahova M, Palenickova E, Dankova H, Sticova E, Burian M, Drahota Z, Cervinkova Z, et al. Metformin prevents ischemia reperfusion-induced oxidative stress in the fatty liver by attenuation of reactive oxygen species formation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015;309:G100-111.
71. Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)* 2012;122:253-270.
72. Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr* 2001;21:193-230.
73. Mannaerts GP, Van Veldhoven PP, Casteels M. Peroxisomal lipid degradation via beta- and alpha-oxidation in mammals. *Cell Biochem Biophys* 2000;32 Spring:73-87.
74. Fromenty B, Robin MA, Igoudjil A, Mansouri A, Pessayre D. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab* 2004;30:121-138.
75. Begriche K, Massart J, Robin MA, Bonnet F, Fromenty B. Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2013;58:1497-1507.
76. Gibbons GF, Islam K, Pease RJ. Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochim Biophys Acta* 2000;1483:37-57.
77. Lee SS, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW, Kroetz DL, Fernandez-Salguero PM, et al. Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol* 1995;15:3012-3022.
78. Hashimoto E, Yatsuji S, Tobari M, Taniai M, Torii N, Tokushige K, Shiratori K. Hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol* 2009;44 Suppl 19:89-95.
79. Moran-Salvador E, Lopez-Parra M, Garcia-Alonso V, Titos E, Martinez-Clemente M, Gonzalez-Periz A, Lopez-Vicario C, et al. Role for PPARgamma in obesity-induced hepatic

steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. *Faseb j* 2011;25:2538-2550.

80. Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2008;134:424-431.

81. Kawano Y, Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2013;48:434-441.

82. Shindo N, Fujisawa T, Sugimoto K, Nojima K, Oze-Fukai A, Yoshikawa Y, Wang X, et al. Involvement of microsomal triglyceride transfer protein in nonalcoholic steatohepatitis in novel spontaneous mouse model. *J Hepatol* 2010;52:903-912.

83. Cohen DE, Fisher EA. Lipoprotein metabolism, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2013;33:380-388.

84. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010;52:1836-1846.

85. Cui R, Gao M, Qu S, Liu D. Overexpression of Superoxide Dismutase 3 Gene Blocks High Fat Diet-induced Obesity, Fatty Liver and Insulin Resistance. *Gene Ther* 2014;21:840-848.

86. Seth RK, Das S, Pourhoseini S, Dattaroy D, Igwe S, Ray JB, Fan D, et al. M1 polarization bias and subsequent nonalcoholic steatohepatitis progression is attenuated by nitric oxide donor DETA NONOate via inhibition of CYP2E1-induced oxidative stress in obese mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2015;352:77-89.

87. Wang F, Reece EA, Yang P. Oxidative stress is responsible for maternal diabetes-impaired transforming growth factor beta signaling in the developing mouse heart. *Am J Obstet Gynecol* 2015;212:650.e651-611.

88. Tomita K, Tamiya G, Ando S, Ohsumi K, Chiyo T, Mizutani A, Kitamura N, et al. Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Gut* 2006;55:415-424.

89. Ramos C, Pedraza-Chaverri J, Becerril C, Cisneros J, Gonzalez-Avila G, Rivera-Rosales R, Sommer B, et al. Oxidative stress and lung injury induced by short-term exposure to wood smoke in guinea pigs. *Toxicol Mech Methods* 2013;23:711-722.

90. Zamara E, Novo E, Marra F, Gentilini A, Romanelli RG, Caligiuri A, Robino G, et al. 4-Hydroxynonenal as a selective pro-fibrogenic stimulus for activated human hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2004;40:60-68.

91. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183-1192.

92. Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Hepatol* 2002;37:56-62.

93. Chalasani N, Deeg MA, Crabb DW. Systemic levels of lipid peroxidation and its metabolic and dietary correlates in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1497-1502.

94. Polimeni L, Del Ben M, Baratta F, Perri L, Albanese F, Pastori D, Violi F, et al. Oxidative stress: New insights on the association of non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis. *World J Hepatol* 2015;7:1325-1336.

95. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:89-102.



96. Zhang XQ, Xu CF, Yu CH, Chen WX, Li YM. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014;20:1768-1776.
97. Dara L, Ji C, Kaplowitz N. The contribution of endoplasmic reticulum stress to liver diseases. *Hepatology* 2011;53:1752-1763.
98. Nakagawa H, Umemura A, Taniguchi K, Font-Burgada J, Dhar D, Ogata H, Zhong Z, et al. ER stress cooperates with hypernutrition to trigger TNF-dependent spontaneous HCC development. *Cancer Cell* 2014;26:331-343.
99. Lavallard VJ, Gual P. Autophagy and non-alcoholic fatty liver disease. 2014;2014:120179.
100. Singh R, Xiang Y, Wang Y, Baikati K, Cuervo AM, Luu YK, Tang Y, et al. Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *J Clin Invest* 2009;119:3329-3339.
101. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 2009;458:1131-1135.
102. Lodder J, Denaes T, Chobert MN, Wan J, El-Benna J, Pawlotsky JM, Lotersztajn S, et al. Macrophage autophagy protects against liver fibrosis in mice. *Autophagy* 2015;11:1280-1292.
103. Zeng TS, Liu FM, Zhou J, Pan SX, Xia WF, Chen LL. Depletion of Kupffer cells attenuates systemic insulin resistance, inflammation and improves liver autophagy in high-fat diet fed mice. *Endocr J* 2015;62:615-626.
104. Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab* 2010;11:467-478.
105. Mallat A, Lodder J. Autophagy: a multifaceted partner in liver fibrosis. 2014;2014:869390.
106. Li Y, Wang S, Ni HM, Huang H, Ding WX. Autophagy in alcohol-induced multiorgan injury: mechanisms and potential therapeutic targets. 2014;2014:498491.
107. Crispe IN. The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol* 2009;27:147-163.
108. Guebre-Xabier M, Yang S, Lin HZ, Schwenk R, Krzych U, Diehl AM. Altered hepatic lymphocyte subpopulations in obesity-related murine fatty livers: potential mechanism for sensitization to liver damage. *Hepatology* 2000;31:633-640.
109. Li Z, Soloski MJ, Diehl AM. Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;42:880-885.
110. Kremer M, Thomas E, Milton RJ, Perry AW, van Rooijen N, Wheeler MD, Zacks S, et al. Kupffer cell and interleukin-12-dependent loss of natural killer T cells in hepatosteatosis. *Hepatology* 2010;51:130-141.
111. Hua J, Ma X, Webb T, Potter JJ, Oelke M, Li Z. Dietary fatty acids modulate antigen presentation to hepatic NKT cells in nonalcoholic fatty liver disease. *J Lipid Res* 2010;51:1696-1703.
112. Elinav E, Pappo O, Sklair-Levy M, Margalit M, Shibolet O, Gomori M, Alper R, et al. Adoptive transfer of regulatory NKT lymphocytes ameliorates non-alcoholic steatohepatitis and glucose intolerance in ob/ob mice and is associated with intrahepatic CD8 trapping. *J Pathol* 2006;209:121-128.
113. Syn WK, Oo YH, Pereira TA, Karaca GF, Jung Y, Omenetti A, Witek RP, et al. Accumulation of natural killer T cells in progressive nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010;51:1998-2007.
114. Ma X, Hua J, Mohamood AR, Hamad AR, Ravi R, Li Z. A high-fat diet and regulatory T cells influence susceptibility to endotoxin-induced liver injury. *Hepatology* 2007;46:1519-1529.

115. Bigorgne AE, Bouchet-Delbos L, Naveau S, Dagher I, Prevot S, Durand-Gasselín I, Couderc J, et al. Obesity-induced lymphocyte hyperresponsiveness to chemokines: a new mechanism of Fatty liver inflammation in obese mice. *Gastroenterology* 2008;134:1459-1469.
116. Shi Z, Wakil AE, Rockey DC. Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:10663-10668.
117. Safadi R, Ohta M, Alvarez CE, Fiel MI, Bansal M, Mehal WZ, Friedman SL. Immune stimulation of hepatic fibrogenesis by CD8 cells and attenuation by transgenic interleukin-10 from hepatocytes. *Gastroenterology* 2004;127:870-882.
118. Muhanna N, Doron S, Wald O, Horani A, Eid A, Pappo O, Friedman SL, et al. Activation of hepatic stellate cells after phagocytosis of lymphocytes: A novel pathway of fibrogenesis. *Hepatology* 2008;48:963-977.
119. Novobrantseva TI, Majeau GR, Amatucci A, Kogan S, Brenner I, Casola S, Shlomchik MJ, et al. Attenuated liver fibrosis in the absence of B cells. *J Clin Invest* 2005;115:3072-3082.
120. Miura K, Yang L, van Rooijen N, Ohnishi H, Seki E. Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;302:G1310-1321.
121. Park JW, Jeong G, Kim SJ, Kim MK, Park SM. Predictors reflecting the pathological severity of non-alcoholic fatty liver disease: comprehensive study of clinical and immunohistochemical findings in younger Asian patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:491-497.
122. Lefkowitz JH, Haythe JH, Regent N. Kupffer cell aggregation and perivenular distribution in steatohepatitis. *Mod Pathol* 2002;15:699-704.
123. Neyrinck AM, Cani PD, Dewulf EM, De Backer F, Bindels LB, Delzenne NM. Critical role of Kupffer cells in the management of diet-induced diabetes and obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;385:351-356.
124. Lanthier N, Molendi-Coste O, Cani PD, van Rooijen N, Horsmans Y, Leclercq IA. Kupffer cell depletion prevents but has no therapeutic effect on metabolic and inflammatory changes induced by a high-fat diet. *Faseb j* 2011;25:4301-4311.
125. Song M, Schuschke DA, Zhou Z, Zhong W, Zhang J, Zhang X, Wang Y, et al. Kupffer cell depletion protects against the steatosis, but not the liver damage, induced by marginal-copper, high-fructose diet in male rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015;308:G934-945.
126. Odegaard JI, Chawla A. Mechanisms of macrophage activation in obesity-induced insulin resistance. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008;4:619-626.
127. Davis JE, Gabler NK, Walker-Daniels J, Spurlock ME. Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:1248-1255.
128. Satoh D, Yagi T, Nagasaka T, Shinoura S, Umeda Y, Yoshida R, Utsumi M, et al. CD14 upregulation as a distinct feature of non-alcoholic fatty liver disease after pancreatoduodenectomy. *World J Hepatol* 2013;5:189-195.
129. Antal-Szalmás P, Poppelier MJ, Broekhuizen R, Verhoef J, van Strijp JA, van Kessel KP. Diverging pathways for lipopolysaccharide and CD14 in human monocytes. *Cytometry* 2000;41:279-288.

130. McDonald B, Jenne CN, Zhuo L, Kimata K, Kubes P. Kupffer cells and activation of endothelial TLR4 coordinate neutrophil adhesion within liver sinusoids during endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013;305:G797-806.
131. Kishore R, Hill JR, McMullen MR, Frenkel J, Nagy LE. ERK1/2 and Egr-1 contribute to increased TNF-alpha production in rat Kupffer cells after chronic ethanol feeding. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:G6-15.
132. Bieghs V, Trautwein C. The innate immune response during liver inflammation and metabolic disease. *Trends Immunol* 2013;34:446-452.
133. Seki E, Brenner DA. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology* 2008;48:322-335.
134. Csak T, Velayudham A, Hritz I, Petrasek J, Levin I, Lippai D, Catalano D, et al. Deficiency in myeloid differentiation factor-2 and toll-like receptor 4 expression attenuates nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;300:G433-441.
135. Rivera CA, Adegboyega P, van Rooijen N, Tagalicud A, Allman M, Wallace M. Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2007;47:571-579.
136. Amar J, Burcelin R, Ruidavets JB, Cani PD, Fauvel J, Alessi MC, Chamontin B, et al. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr* 2008;87:1219-1223.
137. Harte AL, da Silva NF, Creely SJ, McGee KC, Billyard T, Youssef-Elabd EM, Tripathi G, et al. Elevated endotoxin levels in non-alcoholic fatty liver disease. *J Inflamm (Lond)* 2010;7:15.
138. Sharifnia T, Antoun J, Verriere TG, Suarez G, Wattacheril J, Wilson KT, Peek RM, Jr., et al. Hepatic TLR4 signaling in obese NAFLD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015;309:G270-278.
139. World Health Statistics , World Health Organization 2014.
140. La consommation d'alcool en France en 2014, Institut National de Prévention et d'éducation pour la Santé 2015
141. Guerin S, Laplanche A, Dunant A, Hill C. Alcohol-attributable mortality in France. *Eur J Public Health* 2013;23:588-593.
142. Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, Corrao G. Alcohol consumption and the risk of cancer: a meta-analysis. *Alcohol Res Health* 2001;25:263-270.
143. Anderson P. GA, Colom J., INCa (trad.). Alcool et médecine générale. Recommandations cliniques pour le repérage précoce et les interventions brèves. 2008:141.
144. Risques de maladies et de mortalité liés à l'alcool Bases pour des repères de consommation d'alcool à faible risque - Office fédéral de la santé publique Suisse. 2013.
145. Becker U, Deis A, Sorensen TI, Gronbaek M, Borch-Johnsen K, Muller CF, Schnohr P, et al. Prediction of risk of liver disease by alcohol intake, sex, and age: a prospective population study. *Hepatology* 1996;23:1025-1029.
146. Tandra S, Yeh MM, Brunt EM, Vuppalanchi R, Cummings OW, Unalp-Arida A, Wilson LA, et al. Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2011;55:654-659.
147. Baraona E, Lieber CS. Effects of ethanol on lipid metabolism. *J Lipid Res* 1979;20:289-315.
148. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980;55:434-438.

149. Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR. Alcoholic hepatitis. *N Engl J Med* 2009;360:2758-2769.
150. Basaranoglu M, Turhan N, Sonsuz A, Basaranoglu G. Mallory-Denk Bodies in chronic hepatitis. *World J Gastroenterol* 2011;17:2172-2177.
151. Maddrey WC, Boitnott JK, Bedine MS, Weber FL, Jr., Mezey E, White RI, Jr. Corticosteroid therapy of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 1978;75:193-199.
152. Haim-Boukobza S, Coilly A, Sebah M, Bouamoud M, Antonini T, Roche B, Yordanova O, et al. Hepatitis E infection in patients with severe acute alcoholic hepatitis. *Liver Int* 2015;35:870-875.
153. Longo M, Crosignani A, Podda M. Hyperlipidemia in Chronic Cholestatic Liver Disease. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2001;4:111-114.
154. Lands WE. A review of alcohol clearance in humans. *Alcohol* 1998;15:147-160.
155. Elamin EE, Masclee AA, Dekker J, Jonkers DM. Ethanol metabolism and its effects on the intestinal epithelial barrier. *Nutr Rev* 2013;71:483-499.
156. Lieber CS. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim Acta* 1997;257:59-84.
157. Cederbaum AI. Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis* 2012;16:667-685.
158. Albano E, French SW, Ingelman-Sundberg M. Hydroxyethyl radicals in ethanol hepatotoxicity. *Front Biosci* 1999;4:D533-540.
159. Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, Lee PW. Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle* 2011;10:1378-1384.
160. Goedde HW, Agarwal DP, Fritze G, Meier-Tackmann D, Singh S, Beckmann G, Bhatia K, et al. Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations. *Hum Genet* 1992;88:344-346.
161. Eng MY, Luczak SE, Wall TL. ALDH2, ADH1B, and ADH1C genotypes in Asians: a literature review. *Alcohol Res Health* 2007;30:22-27.
162. Collin A, Hardonniere K, Chevanne M, Vuillemin J, Podechard N, Burel A, Dimanche-Boitrel MT, et al. Cooperative interaction of benzo[a]pyrene and ethanol on plasma membrane remodeling is responsible for enhanced oxidative stress and cell death in primary rat hepatocytes. *Free Radic Biol Med* 2014;72:11-22.
163. Ji C, Deng Q, Kaplowitz N. Role of TNF-alpha in ethanol-induced hyperhomocysteinemia and murine alcoholic liver injury. *Hepatology* 2004;40:442-451.
164. Crabb DW. Alcohol deranges hepatic lipid metabolism via altered transcriptional regulation. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2004;115:273-287.
165. You M, Fischer M, Deeg MA, Crabb DW. Ethanol induces fatty acid synthesis pathways by activation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP). *J Biol Chem* 2002;277:29342-29347.
166. Ceni E, Mello T, Galli A. Pathogenesis of alcoholic liver disease: role of oxidative metabolism. *World J Gastroenterol* 2014;20:17756-17772.
167. Nanji AA, Dannenberg AJ, Jokelainen K, Bass NM. Alcoholic liver injury in the rat is associated with reduced expression of peroxisome proliferator-alpha (PPARalpha)-regulated genes and is ameliorated by PPARalpha activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310:417-424.
168. Sampey BP, Stewart BJ, Petersen DR. Ethanol-induced modulation of hepatocellular extracellular signal-regulated kinase-1/2 activity via 4-hydroxynonenal. *J Biol Chem* 2007;282:1925-1937.

169. Yamada S, Mochida S, Ohno A, Hirata K, Ogata I, Ohta Y, Fujiwara K. Evidence for enhanced secretory function of hepatic macrophages after long-term ethanol feeding in rats. *Liver* 1991;11:220-224.
170. Yin M, Wheeler MD, Kono H, Bradford BU, Gallucci RM, Luster MI, Thurman RG. Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology* 1999;117:942-952.
171. Adachi Y, Bradford BU, Gao W, Bojes HK, Thurman RG. Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology* 1994;20:453-460.
172. Kono H, Rusyn I, Yin M, Gabele E, Yamashina S, Dikalova A, Kadiiska MB, et al. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J Clin Invest* 2000;106:867-872.
173. Wheeler MD, Kono H, Yin M, Nakagami M, Uesugi T, Arteel GE, Gabele E, et al. The role of Kupffer cell oxidant production in early ethanol-induced liver disease. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1544-1549.
174. Kono H, Rusyn I, Uesugi T, Yamashina S, Connor HD, Dikalova A, Mason RP, et al. Diphenyleneiodonium sulfate, an NADPH oxidase inhibitor, prevents early alcohol-induced liver injury in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G1005-1012.
175. Lieber CS. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 2004;34:9-19.
176. Nanji AA, Khettry U, Sadrzadeh SM, Yamanaka T. Severity of liver injury in experimental alcoholic liver disease. Correlation with plasma endotoxin, prostaglandin E2, leukotriene B4, and thromboxane B2. *Am J Pathol* 1993;142:367-373.
177. Wang Y, Kirpich I, Liu Y, Ma Z, Barve S, McClain CJ, Feng W. Lactobacillus rhamnosus GG Treatment Potentiates Intestinal Hypoxia-Inducible Factor, Promotes Intestinal Integrity and Ameliorates Alcohol-Induced Liver Injury. *Am J Pathol* 2011;179:2866-2875.
178. Enomoto N, Ikejima K, Yamashina S, Hirose M, Shimizu H, Kitamura T, Takei Y, et al. Kupffer cell sensitization by alcohol involves increased permeability to gut-derived endotoxin. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:51s-54s.
179. Wheeler MD, Thurman RG. Up-regulation of CD14 in liver caused by acute ethanol involves oxidant-dependent AP-1 pathway. *J Biol Chem* 2003;278:8435-8441.
180. Uesugi T, Froh M, Arteel GE, Bradford BU, Thurman RG. Toll-like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol-induced liver injury in mice. *Hepatology* 2001;34:101-108.
181. Yin M, Bradford BU, Wheeler MD, Uesugi T, Froh M, Goyert SM, Thurman RG. Reduced early alcohol-induced liver injury in CD14-deficient mice. *J Immunol* 2001;166:4737-4742.
182. Uesugi T, Froh M, Arteel GE, Bradford BU, Wheeler MD, Gabele E, Isayama F, et al. Role of lipopolysaccharide-binding protein in early alcohol-induced liver injury in mice. *J Immunol* 2002;168:2963-2969.
183. Hritz I, Mandrekar P, Velayudham A, Catalano D, Dolganiuc A, Kodys K, Kurt-Jones E, et al. The critical role of toll-like receptor (TLR) 4 in alcoholic liver disease is independent of the common TLR adapter MyD88. *Hepatology* 2008;48:1224-1231.
184. Kato J, Sato Y, Inui N, Nakano Y, Takimoto R, Takada K, Kobune M, et al. Ethanol induces transforming growth factor-alpha expression in hepatocytes, leading to stimulation of collagen synthesis by hepatic stellate cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2003;27:58S-63S.

185. Matsuoka M, Tsukamoto H. Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor beta: implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis. *Hepatology* 1990;11:599-605.
186. Cubero FJ, Urtasun R, Nieto N. Alcohol and liver fibrosis. *Semin Liver Dis* 2009;29:211-221.
187. Jeong WI, Park O, Gao B. Abrogation of the antifibrotic effects of natural killer cells/interferon-gamma contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis. *Gastroenterology* 2008;134:248-258.
188. Szabo G, Mandrekar P. A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. *Alcohol Clin Exp Res* 2009;33:220-232.
189. Horiguchi N, Wang L, Mukhopadhyay P, Park O, Jeong WI, Lafdil F, Osei-Hyiaman D, et al. Cell type-dependent pro- and anti-inflammatory role of signal transducer and activator of transcription 3 in alcoholic liver injury. *Gastroenterology* 2008;134:1148-1158.
190. Melhem A, Muhanna N, Bishara A, Alvarez CE, Ilan Y, Bishara T, Horani A, et al. Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC. *J Hepatol* 2006;45:60-71.
191. Radaeva S, Sun R, Jaruga B, Nguyen VT, Tian Z, Gao B. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology* 2006;130:435-452.
192. Minagawa M, Deng Q, Liu ZX, Tsukamoto H, Dennert G. Activated natural killer T cells induce liver injury by Fas and tumor necrosis factor-alpha during alcohol consumption. *Gastroenterology* 2004;126:1387-1399.
193. Cui K, Yan G, Xu C, Chen Y, Wang J, Zhou R, Bai L, et al. Invariant NKT cells promote alcohol-induced steatohepatitis through interleukin-1beta in mice. *J Hepatol* 2015;62:1311-1318.
194. Bode C, Bode JC. Activation of the innate immune system and alcoholic liver disease: effects of ethanol per se or enhanced intestinal translocation of bacterial toxins induced by ethanol? *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:166S-171S.
195. Yan AW, Schnabl B. Bacterial translocation and changes in the intestinal microbiome associated with alcoholic liver disease. *World J Hepatol* 2012;4:110-118.
196. Balmer ML, Slack E, de Gottardi A, Lawson MA, Hapfelmeier S, Miele L, Grieco A, et al. The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. *Sci Transl Med* 2014;6:237ra266.
197. Schnabl B, Brenner DA. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases. *Gastroenterology* 2014;146:1513-1524.
198. Sommer F, Backhed F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:227-238.
199. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005;307:1915-1920.
200. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 2012;489:220-230.
201. Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006;312:1355-1359.
202. Coudeyras S, Forestier C. [Microbiota and probiotics: effects on human health]. *Can J Microbiol* 2010;56:611-650.

203. Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol Immunol* 2002;46:535-548.
204. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* 2015;21:8787-8803.
205. Juste C. [Dietary fatty acids, intestinal microbiota and cancer]. *Bull Cancer* 2005;92:708-721.
206. Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett* 2002;217:133-139.
207. Gerard P, Lepercq P, Leclerc M, Gavini F, Raibaud P, Juste C. *Bacteroides* sp. strain D8, the first cholesterol-reducing bacterium isolated from human feces. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:5742-5749.
208. Veiga P, Juste C, Lepercq P, Saunier K, Beguet F, Gerard P. Correlation between faecal microbial community structure and cholesterol-to-coprostanol conversion in the human gut. *FEMS Microbiol Lett* 2005;242:81-86.
209. Ridlon JM, Hylemon PB. A potential role for resistant starch fermentation in modulating colonic bacterial metabolism and colon cancer risk. *Cancer biology & therapy* 2006;5:273-274.
210. Gerard P. Metabolism of cholesterol and bile acids by the gut microbiota. *Pathogens* 2013;3:14-24.
211. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:15718-15723.
212. Ramakrishna BS. Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism. *J Gastroenterol Hepatol* 2013;28 Suppl 4:9-17.
213. Rochat F. [Biological effects of intestinal flora modifiers]. *Arch Pediatr* 2004;11:576-577.
214. Smith K, McCoy KD, Macpherson AJ. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin Immunol* 2007;19:59-69.
215. Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet JP, Ugarte E, et al. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol* 2009;11:2574-2584.
216. Abdul-Hai A, Abdallah A, Malnick SD. Influence of gut bacteria on development and progression of non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 2015;7:1679-1684.
217. Zoetendal EG, Akkermans AD, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:3854-3859.
218. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011;473:174-180.
219. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16731-16736.
220. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, Feldstein AE, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 2011;472:57-63.

221. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, Britt EB, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med* 2013;19:576-585.
222. Koeth RA, Levison BS, Culley MK, Buffa JA, Wang Z, Gregory JC, Org E, et al. gamma-Butyrobetaine is a proatherogenic intermediate in gut microbial metabolism of L-carnitine to TMAO. *Cell Metab* 2014;20:799-812.
223. Leclercq S, Matamoros S, Cani PD, Neyrinck AM, Jamar F, Starkel P, Windey K, et al. Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:E4485-4493.
224. Mayer EA, Padua D, Tillisch K. Altered brain-gut axis in autism: comorbidity or causative mechanisms? *Bioessays* 2014;36:933-939.
225. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science translational medicine* 2009;1:6ra14.
226. Khan MT, Nieuwdorp M, Backhed F. Microbial modulation of insulin sensitivity. *Cell Metab* 2014;20:753-760.
227. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006;444:1027-1031.
228. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 2013;500:541-546.
229. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006;444:1022-1023.
230. Spencer MD, Hamp TJ, Reid RW, Fischer LM, Zeisel SH, Fodor AA. Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency. *Gastroenterology* 2011;140:976-986.
231. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, Guiot Y, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:9066-9071.
232. Dao MC, Everard A, Aron-Wisnewsky J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO, Kayser BD, et al. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut* 2015.
233. Ritze Y, Bardos G, Claus A, Ehrmann V, Bergheim I, Schwartz A, Bischoff SC. *Lactobacillus rhamnosus* GG protects against non-alcoholic fatty liver disease in mice. *PLoS One* 2014;9:e80169.
234. Jegatheesan P, Beutheu S, Ventura G, Sarfati G, Nubret E, Kapel N, Waligora-Dupriet AJ, et al. Effect of specific amino acids on hepatic lipid metabolism in fructose-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Nutr* 2015.
235. Mouzaki M, Comelli EM, Arendt BM, Bonengel J, Fung SK, Fischer SE, McGilvray ID, et al. Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2013;58:120-127.
236. Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhouri R, Baker RD, Gill SR. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology* 2013;57:601-609.



237. Le Roy T, Llopis M, Lepage P, Bruneau A, Rabot S, Bevilacqua C, Martin P, et al. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* 2013;62:1787-1794.
238. Adachi Y, Moore LE, Bradford BU, Gao W, Thurman RG. Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterology* 1995;108:218-224.
239. Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, Masciana R, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2009;49:1877-1887.
240. Szabo G, Bala S, Petrasek J, Gattu A. Gut-liver axis and sensing microbes. *Dig Dis* 2010;28:737-744.
241. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009;9:799-809.
242. Keshavarzian A, Holmes EW, Patel M, Iber F, Fields JZ, Pethkar S. Leaky gut in alcoholic cirrhosis: a possible mechanism for alcohol-induced liver damage. *Am J Gastroenterol* 1999;94:200-207.
243. Trebicka J, Krag A, Gansweid S, Appenrodt B, Schiedermaier P, Sauerbruch T, Spengler U. Endotoxin and tumor necrosis factor-receptor levels in portal and hepatic vein of patients with alcoholic liver cirrhosis receiving elective transjugular intrahepatic portosystemic shunt. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011;23:1218-1225.
244. Keshavarzian A, Farhadi A, Forsyth CB, Rangan J, Jakate S, Shaikh M, Banan A, et al. Evidence that chronic alcohol exposure promotes intestinal oxidative stress, intestinal hyperpermeability and endotoxemia prior to development of alcoholic steatohepatitis in rats. *J Hepatol* 2009;50:538-547.
245. Purohit V, Bode JC, Bode C, Brenner DA, Choudhry MA, Hamilton F, Kang YJ, et al. Alcohol, intestinal bacterial growth, intestinal permeability to endotoxin, and medical consequences: summary of a symposium. *Alcohol* 2008;42:349-361.
246. Yan AW, Fouts DE, Brandl J, Starkel P, Torralba M, Schott E, Tsukamoto H, et al. Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology* 2011;53:96-105.
247. Bull-Otterson L, Feng W, Kirpich I, Wang Y, Qin X, Liu Y, Gobejishvili L, et al. Metagenomic analyses of alcohol induced pathogenic alterations in the intestinal microbiome and the effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG treatment. *PLoS One* 2013;8:e53028.
248. Mutlu E, Keshavarzian A, Engen P, Forsyth CB, Sikaroodi M, Gillevet P. Intestinal dysbiosis: a possible mechanism of alcohol-induced endotoxemia and alcoholic steatohepatitis in rats. *Alcoholism, clinical and experimental research* 2009;33:1836-1846.
249. Hartmann P, Chen P, Wang HJ, Wang L, McCole DF, Brandl K, Starkel P, et al. Deficiency of intestinal mucin-2 ameliorates experimental alcoholic liver disease in mice. *Hepatology* 2013;58:108-119.
250. Wouters K, van Gorp PJ, Bieghs V, Gijbels MJ, Duimel H, Lutjohann D, Kerksiek A, et al. Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2008;48:474-486.
251. Tang T, Sui Y, Lian M, Li Z, Hua J. Pro-inflammatory activated Kupffer cells by lipids induce hepatic NKT cells deficiency through activation-induced cell death. *PLoS One* 2013;8:e81949.
252. Prieur X, Roszer T, Ricote M. Lipotoxicity in macrophages: evidence from diseases associated with the metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:327-337.

253. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007;117:175-184.
254. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* 2008;118:2992-3002.
255. Kawano Y, Nishiumi S, Saito M, Yano Y, Azuma T, Yoshida M. Identification of Lipid Species Linked to the Progression of Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Curr Drug Targets* 2015.
256. Arguello G, Balboa E, Arrese M, Zanlungo S. Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852:1765-1778.
257. Gruben N, Shiri-Sverdlov R, Koonen DP, Hofker MH. Nonalcoholic fatty liver disease: A main driver of insulin resistance or a dangerous liaison? *Biochim Biophys Acta* 2014;1842:2329-2343.
258. Aouadi M, Tesz GJ, Nicoloso SM, Wang M, Chouinard M, Soto E, Ostroff GR, et al. Orally delivered siRNA targeting macrophage Map4k4 suppresses systemic inflammation. *Nature* 2009;458:1180-1184.
259. Vos MB, Kimmons JE, Gillespie C, Welsh J, Blanck HM. Dietary fructose consumption among US children and adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Medscape J Med* 2008;10:160.
260. Tetri LH, Basaranoglu M, Brunt EM, Yerian LM, Neuschwander-Tetri BA. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295:G987-995.
261. Basaranoglu M, Basaranoglu G, Sabuncu T, Senturk H. Fructose as a key player in the development of fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2013;19:1166-1172.
262. Bergheim I, Weber S, Vos M, Kramer S, Volynets V, Kaserouni S, McClain CJ, et al. Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin. *J Hepatol* 2008;48:983-992.
263. Lopez-Siles M, Khan TM, Duncan SH, Harmsen HJ, Garcia-Gil LJ, Flint HJ. Cultured representatives of two major phylogroups of human colonic *Faecalibacterium prausnitzii* can utilize pectin, uronic acids, and host-derived substrates for growth. *Appl Environ Microbiol* 2012;78:420-428.
264. Shinohara K, Ohashi Y, Kawasumi K, Terada A, Fujisawa T. Effect of apple intake on fecal microbiota and metabolites in humans. *Anaerobe* 2010;16:510-515.
265. Canesso MCC LN, Ferreira CM, Gonçalves JL, Almeida D, Gamba C, Cassali G, Pedroso SH, Moreira C, Martins FS, Nicoli JR, Teixeira MM, Godard ALB, Vieira AT. Comparing the effects of acute alcohol consumption in germ-free and conventional mice: the role of the gut microbiota. *BMC Microbiol* 2014;14:240.
266. Wrzosek L, Miquel S, Noordine ML, Bouet S, Joncquel Chevalier-Curt M, Robert V, Philippe C, et al. *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC biology* 2013;11:61.
267. Basuroy S, Sheth P, Mansbach CM, Rao RK. Acetaldehyde disrupts tight junctions and adherens junctions in human colonic mucosa: protection by EGF and L-glutamine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:G367-375.
268. Zhong W, Li Q, Sun Q, Zhang W, Zhang J, Sun X, Yin X, et al. Preventing Gut Leakiness and Endotoxemia Contributes to the Protective Effect of Zinc on Alcohol-Induced Steatohepatitis in Rats. *J Nutr* 2015.

269. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci* 2013;70:631-659.
270. Vaishnava S, Yamamoto M, Severson KM, Ruhn KA, Yu X, Koren O, Ley R, et al. The antibacterial lectin RegIII $\gamma$  promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* 2011;334:255-258.
271. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* 2009;89:147-191.
272. Jones ML, Martoni CJ, Ganopoulos JG, Labbe A, Prakash S. The human microbiome and bile acid metabolism: dysbiosis, dysmetabolism, disease and intervention. *Expert Opin Biol Ther* 2014;14:467-482.
273. Llopis M. C-DAM, Wrzosek L., Boschat L., Ferrere G., A. Bruneau A. , Puchois V., Martin J. C., Lepage P., Le Roy T., Lefèvre L., Langelier B. , Cailleux F., González-Castro A. M., Rabot S., Gaudin F., Agostini H., Prévot S., Berrebi D., Ciocan D., Jousse C., Naveau S., Gérard P., Perlemuter G. . Intestinal microbiota contributes to individual susceptibility to alcoholic liver disease . *Gut* 2015.
274. Okubo H, Sakoda H, Kushiya A, Fujishiro M, Nakatsu Y, Fukushima T, Matsunaga Y, et al. *Lactobacillus casei* strain Shirota protects against nonalcoholic steatohepatitis development in a rodent model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013;305:G911-918.
275. Wagnerberger S, Spruss A, Kanuri G, Stahl C, Schroder M, Vetter W, Bischoff SC, et al. *Lactobacillus casei* Shirota protects from fructose-induced liver steatosis: a mouse model. *J Nutr Biochem* 2013;24:531-538.
276. Zhao H, Zhao C, Dong Y, Zhang M, Wang Y, Li F, Li X, et al. Inhibition of miR122a by *Lactobacillus rhamnosus* GG culture supernatant increases intestinal occludin expression and protects mice from alcoholic liver disease. *Toxicol Lett* 2015;234:194-200.
277. Shi X, Wei X, Yin X, Wang Y, Zhang M, Zhao C, Zhao H, et al. Hepatic and fecal metabolomic analysis of the effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on alcoholic fatty liver disease in mice. *J Proteome Res* 2015;14:1174-1182.
278. Zhong W, Zhou Z. Alterations of the gut microbiome and metabolome in alcoholic liver disease. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2014;5:514-522.
279. Miura K, Ohnishi H. Role of gut microbiota and Toll-like receptors in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014;20:7381-7391.
280. Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, Lavine JE, Van Natta ML, Abdelmalek MF, Chalasani N, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2015;385:956-965.
281. Pean N, Doignon I, Garcin I, Besnard A, Julien B, Liu B, Branchereau S, et al. The receptor TGR5 protects the liver from bile acid overload during liver regeneration in mice. *Hepatology* 2013;58:1451-1460.
282. Jourdainne V, Pean N, Doignon I, Humbert L, Rainteau D, Tordjmann T. The Bile Acid Receptor TGR5 and Liver Regeneration. *Dig Dis* 2015;33:319-326.





## Rôle des cellules de Kupffer et du microbiote intestinal dans les hépatopathies métaboliques

**Mots clés :** NAFLD, MAF, microbiote intestinal, fructose, probiotiques , prébiotiques

Les hépatopathies métaboliques regroupent les maladies non alcooliques du foie (NAFLD) et les maladies alcooliques du foie (MAF) causées respectivement par l'obésité ou une consommation excessive d'alcool. Ces pathologies vont de la simple stéatose à des formes aggravées pouvant aller jusqu'au carcinome hépatocellulaire. D'autres facteurs que le surpoids ou l'abus d'alcool jouent un rôle dans la susceptibilité des patients à développer une NAFLD ou une MAF. Cette thèse a pour objectif de clarifier et d'étudier les mécanismes et les facteurs participant à l'installation de l'inflammation dans ces deux pathologies. Mes travaux ont porté d'une part sur le rôle de la cellule de Kupffer dans les étapes précoces de la NAFLD et d'autre part sur l'étude du microbiote intestinal comme cofacteur déclenchant de la MAF.

La cellule de Kupffer lors de la stéatose, étape précoce de la NAFLD, présente une dérégulation de son homéostasie lipidique qui participe à son phénotype pro-inflammatoire et favorise l'inflammation hépatique. L'impact du fructose, largement utilisé dans notre alimentation actuelle, a été étudié et aggrave l'inflammation hépatique lors d'un régime hyperlipidique et ceci est associé à une dysbiose spécifique. Dans la MAF, une dysbiose intestinale, une diminution des *Bacteroides*, a été associée aux lésions hépatiques dans un modèle murin d'alcoolisation. L'utilisation de traitements permettant de maintenir cette population à des taux élevés a corrigé cette dysbiose et protégé les animaux face aux lésions hépatiques.

Ces travaux permettent d'envisager le MI comme une cible prometteuse permettant de contrôler l'évolution des hépatopathies métaboliques vers des formes sévères.

## Role of Kupffer cells and intestinal microbiota in metabolic liver diseases

**Keywords :** NAFLD, ALD, intestinal microbiota, fructose probiotic , prebiotic

Metabolic hepatopathies is including Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Alcoholic Liver Disease (ALD) due to an excessive consumption of alimentation or alcohol. The pathologies range from simple steatosis to aggravated forms until hepatocellular carcinoma. Other factors than overweight or alcohol abuse play a role in sensitivity of patients to develop NAFLD or ALD. The aim of this thesis is to clarify and study the mechanisms and factors that lead to the installation of inflammation in those pathologies. My work covered in part on the role of Kupffer cell in the early stages of NAFLD and secondly on the study of intestinal microbiota as a cofactor triggering the MAF.

The Kupffer cell role in steatosis, the early stages of NAFLD, showed a deregulation of its lipid homeostasis involved in the pro-inflammatory phenotype and promotes liver inflammation. The impact of fructose, widely used in our current diet, was studied and worsening liver inflammation during high fat diet. This is associated with a specific dysbiosis. In ALD, intestinal dysbiosis, a decrease of *Bacteroides*, leading to liver damage has been established. The use of treatments to maintain this population with high levels corrected the dysbiosis and has protected animals against liver damages.

Both works on the NAFLD and ALD establish MI is a promising target to control the evolution of metabolic liver diseases toward aggravated forms.